

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie

Einfluss bluthaltiger und blutfreier Nährmedien auf  
das Wachstum, das Fettsäuremuster und die Morphologie von  
*Helicobacter pylori*

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften in der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät der  
Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Andrea Haar, geb. Pratsch  
aus Moers  
2006

Dekan: Univ.- Prof. Dr. K.-H. Jöckel

1. Gutachter: Univ.- Prof. Dr. R. Ansorg

2. Gutachter: Univ.- Prof. Dr. G. Gerken

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juli 2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINFÜHRUNG</b>	<b>4</b>
1.1	Die Gattung <i>Helicobacter</i>	4
1.2	<i>Helicobacter</i> in der Veterinärmedizin	5
1.3	<i>Helicobacter</i> in der Humanmedizin	7
1.4	Eigenschaften und Wachstumsbedingungen von <i>H. pylori</i>	8
1.5	Nährmedien zur Isolierung von <i>H. pylori</i>	8
1.6	Morphologie von <i>H. pylori</i>	10
1.7	Fettsäuremuster von <i>H. pylori</i>	11
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
3.1	<i>H. pylori</i> -Stämme	14
3.2	Nährmedien	16
3.2.1	Grundsubstrate	16
3.2.2	Nährmedienzubereitungen	17
3.3	Reagenzien und Geräte	20
3.4	Methoden	23
3.4.1	Färbemethode	23
3.4.2	Bestimmung des Fettsäuremusters von <i>H. pylori</i> mittels Flüssiggaschromatographie	23
3.4.3	Bestimmung des Fettsäuremusters in unbeimpften Nährmedien mittels Flüssiggaschromatographie	26
3.4.4	Herstellung von <i>H. pylori</i> -Suspensionen mit dem Trübungsstandard McFarland Nr. 3	26
3.4.5	Statistische Verfahren	28
3.5	<b>Einfluss steigender Blutkonzentrationen im Nährmedium auf die Koloniebildungszeit, die Kulturausbeute und das Fettsäuremuster von <i>H. pylori</i></b>	<b>29</b>
3.5.1	Einfluss steigender Blutkonzentrationen im Nährmedium auf die Koloniebildungszeit von <i>H. pylori</i>	29
3.5.2	Einfluss steigender Blutkonzentration im Nährmedium auf die Kulturausbeute von <i>H. pylori</i>	30
3.5.3	Einfluss steigender Blutkonzentrationen im Nährmedium auf das Fettsäuremuster von <i>H. pylori</i>	30

<b>3.6</b>	<b>Einfluss steigender Albuminkonzentrationen im Nährmedium auf die Koloniebildungszeit, die Kulturausbeute und das Fettsäuremuster von <i>H. pylori</i></b>	<b>31</b>
3.6.1	Einfluss steigender Albuminkonzentrationen im Nährmedium auf die Koloniebildungszeit von <i>H. pylori</i>	31
3.6.2	Einfluss steigender Albuminkonzentrationen im Nährmedium auf die Kulturausbeute von <i>H. pylori</i>	32
3.6.3	Einfluss steigender Albuminkonzentrationen im Nährmedium auf das Fettsäuremuster von <i>H. pylori</i>	32
<b>3.7</b>	<b>Einfluss zunehmender Kulturdauer auf bluthaltigen und albuminhaltigen Nährmedien auf die Morphologie und das Fettsäuremuster von <i>H. pylori</i></b>	<b>33</b>
3.7.1	Einfluss zunehmender Kulturdauer auf die Zellmorphologie von <i>H. pylori</i>	33
3.7.2	Einfluss zunehmender Kulturdauer auf das Fettsäuremuster von <i>H. pylori</i>	34
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Fettsäuren in den Nährmedien</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Einfluss steigender Blut- und Albuminkonzentrationen im Nährmedium auf die Koloniebildungszeit von <i>H. pylori</i></b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Einfluss steigender Blut- und Albuminkonzentrationen im Nährmedium auf die Kulturausbeute von <i>H. pylori</i></b>	<b>38</b>
<b>4.4</b>	<b>Einfluss steigender Blut- und Albuminkonzentrationen im Nährmedium auf das Fettsäuremuster von <i>H. pylori</i></b>	<b>45</b>
<b>4.5</b>	<b>Einfluss zunehmender Kulturdauer auf die Zellmorphologie und das Fettsäuremuster von <i>H. pylori</i></b>	<b>54</b>
4.5.1	Einfluss zunehmender Kulturdauer auf die Zellmorphologie von <i>H. pylori</i>	54
4.5.2	Einfluss zunehmender Kulturdauer auf das Fettsäuremuster von <i>H. pylori</i>	57
4.5.3	Vergleich der Änderungen von Zellmorphologie und Fettsäuremuster von <i>H. pylori</i> mit zunehmender Kulturdauer	61
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>62</b>
<b>5.1</b>	<b>Einfluss der Nährmedienzusammensetzung auf das Wachstum und das Fettsäuremuster von <i>Helicobacter pylori</i></b>	<b>62</b>
<b>5.2</b>	<b>Die Zellmorphologie von <i>H. pylori</i></b>	<b>64</b>
<b>5.3</b>	<b>Das Fettsäuremuster von <i>H. pylori</i></b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>73</b>

<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS -----</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG-----</b>	<b>86</b>
<b>8.1</b>	<b>Abbildungen -----</b>	<b>86</b>
<b>8.2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis -----</b>	<b>88</b>
<b>8.3</b>	<b>Tabellenverzeichnis -----</b>	<b>89</b>

# 1 Einführung

## 1.1 Die Gattung *Helicobacter*

Das Genus *Helicobacter* umfasst ca. 28 Species (Tabelle 1). Sie werden nach ihrem vorrangigen Habitat in gastrische und enterohepatische Species unterteilt. Etwa ein Drittel der *Helicobacter*species sind gastrische Vertreter, zwei Drittel sind sogenannte enterohepatische *Helicobacter*species, die sich im Darm und in der Leber ansiedeln. Alle Vertreter der Gattung *Helicobacter* konnten von verschiedenen Tieren isoliert werden. Etwa zehn Arten kommen beim Menschen vor.

**Tabelle 1:** Übersicht über Species des Genus *Helicobacter*

<b><i>Helicobacter</i>species</b>	<b>isoliert von</b>	<b>Literaturquelle</b>
<i>H. acinonychis</i>	Gepard	Eaton et al. 1993
<i>H. aurati</i>	Goldhamster	Patterson et al. 2000
<i>H. bilis</i>	Maus	Fox et al. 1995
<i>H. bizzozeronii</i>	Hund	Cattoli et al. 1999
<i>H. bovis</i>	Rind	DeGroote 1999,2004
<i>H. canadensis</i>	Gans, Mensch	Waldenström et al. 2003
<i>H. canis</i>	Hund, Katze, Mensch	Fox et al. 1996, Foley et al. 1999, Fox 2002
<i>H. cetorum</i>	Delphin, Belugawal	Harper et al. 1999, 2002
<i>H. cholecystus</i>	Goldhamster	Solnick et al. 2001
<i>H. cinaedi</i>	Goldhamster, Rhesusaffe, Hund, Katze, Mensch	Kiehlbauch et al. 1995, Fox 2002
<i>H. felis</i>	Katze, Hund, Mensch	Lee et al. 1988, Cattoli et al. 1999, Fox 2002
<i>H. fenelliae</i>	Affe, Hund, Mensch	Kiehlbauch et al. 1995
<i>H. heilmannii</i>	Hund, Katze, Schwein, Affe, Wildkatzen, Kaninchen, Ratte, Mensch	Dieterich et al. 1998, Fox 2002, Happonen et al. 1996, V.d.Bulck et al. 2005
<i>H. hepaticus</i>	Maus	Fox et al. 1994
<i>H. marmotae</i>	Murmeltier, Katze	Fox et al. 2002
<i>H. mesocricetorum</i>	Goldhamster	Simmons et al. 2000
<i>H. muridarum</i>	Ratte, Maus	Lee et al. 1992
<i>H. mustelae</i>	Frettchen	Patterson et al. 2003
<i>H. pametensis</i>	Vogel, Schwein, Katze, Mensch	Fox 1994, Solnick et al. 2001
<i>H. pullorum</i>	Huhn, Mensch	Stanley 1994
<i>H. pylori</i>	Katze, Rhesusaffe, Mensch	Handt et al. 1995, 1997
<i>H. rodentium</i>	Maus	Shen et al. 1997
<i>H. salomonis</i>	Hund	Solnick et al. 2001
<i>H. suis</i>	Schwein	Young 2001, 2004
<i>H. trogonum</i>	Ratte, Schwein, Schaf	Hänninen et al. 2003
<i>H. typhlonius</i>	Maus	Franklin et al. 2001
<i>H. westmeadii</i>	Mensch	Fox 2002
<i>H. winthamensis</i>	Mensch	Fox 2002

Die Nomenklatur unterliegt einem ständigen Wandel. Dies liegt unter anderem daran, dass ständig neue *Helicobacterspecies* gefunden werden, die auf ihre Einordnung und Benennung warten. Allein im Jahr 2004 wurden mehrere neue Species bei Seelöwen entdeckt (Oxley et al. 2004). Ein zweiter Grund für die Änderungen in der Nomenklatur sind Umbenennungen bekannter Species. Als Namensgeber für eine neue *Helicobacterspecies* dient häufig die Tierart, aus der die Species erstmals isoliert wurde. Zum Beispiel wurde *H. mustelae* von Frettchen (lat. *mustela putorius*) isoliert und *H. mesocricetorus* und *H. aurati* von Goldhamstern (lat. *mesocricetus auratus*) (Fox, Cabot et al. 1988, Simmons et al. 2000, Patterson, Schrenzel et al. 2000). Zum Teil auch zeigen eingehendere Untersuchungen, dass zunächst als separate Species beschriebene Arten zusammengehören. Zum Beispiel wurde eine Anfang der neunziger Jahre von Schweinsaffen (lat. *macaca nemestrina*) isolierte neue *Helicobacter*art zunächst *H. nemestrinae* genannt, nach der Sequenzierung der 16S rRNA aber *H. pylori* zugeordnet (Suerbaum et al. 2002). Ebenfalls durch die Sequenzierung der 16S rRNA wurde die Species *H. pullorum* in zwei separate Species - *H. pullorum* und *H. canadensis* - unterteilt (Solnick et al. 2001).

## 1.2 *Helicobacter* in der Veterinärmedizin

Frühe Beschreibungen spiraliger Bakterien im Magen von Tieren oder Menschen gab es bereits Ende des neunzehnten Jahrhunderts. Rappin 1881, Bizzozzero 1892 und Salomon 1896 beschrieben das Vorkommen von spiraligen Bakterien im Magen von Hunden und Katzen. Aufmerksamkeit als mögliche Krankheitserreger wurde diesen aber erst mit der Entdeckung von *Helicobacter pylori* 1984 gewidmet. Bis dahin wurden die Organismen bei Tieren wie auch beim Menschen als harmlose Kommensalen im Verdauungsapparat angesehen.

Im Folgenden werden ausgewählte *Helicobacter*arten und ihre Bedeutung bei bestimmten Tierarten vorgestellt.

*H. cetorum* wurde 1999 von gestrandeten Delphinen isoliert (Harper et al. 1999) und 2002 offiziell als *Helicobacter* klassifiziert und nach den Wältieren (lat. *cetaceae*) benannt. *Helicobacter cetorum* ist damit die zurzeit jüngste offizielle *Helicobacterspecies*. Bei in Gefangenschaft gehaltenen *H. cetorum* positiven Delphinen und Belugawalen wurden

Inappetenz und Regurgitieren beobachtet und es konnten Gastritiden sowie Oesophagus- und Vormagenulcera nachgewiesen werden (Harper et al. 2000, 2002, 2003).

*H. acinonychis* wurde 1991 von in Gefangenschaft gehaltenen Geparden (lat. *acinonyx jubatus*) mit Gastritis isoliert (Eaton et al. 1991) und zwei Jahre später klassifiziert (Eaton et al. 1993). Diese Entdeckung war bedeutend, da chronische Gastritiden ein erhebliches Problem bei in Gefangenschaft gehaltenen Geparden darstellen. Klinisch fallen diese Tiere durch chronisches Erbrechen, Inappetenz und Gewichtsverlust auf. Antibiotische Therapien konnten die Symptome lindern, die Tiere blieben aber weiterhin *H. acinonychis* positiv (Solnick et al. 2005). Freilebende Geparde sind ebenfalls häufig mit spiraligen Organismen im Magen infiziert, jedoch treten nahezu keine Symptome auf. Nach Untersuchungen der 16S rRNA-Sequenz ist *H. acinonychis* die vermutlich am engsten mit *H. pylori* verwandte *Helicobacterspecies*; *H. acinonychis* wird im Gegensatz zu *H. pylori* nur 2 µm lang, in ihren sonstigen morphologischen und biochemischen Merkmalen unterscheiden sich diese beiden Species nicht (Fox et al. 2002).

*Helicobacter heilmannii* ist die *Helicobacter*art mit dem wohl weitesten Wirtsspektrum im Tierreich. Es reicht von Kleinnagern über Wildkatzen, Hauskatzen, Hunde, Schweine bis hin zu verschiedenen Primatenarten inklusive des Menschen (Dieterich et al. 1998, Eaton et al. 1991, Eaton et al. 1996, Fox 2002, Queiroz et al. 1996). Der Name *Helicobacter heilmannii* ist keine offizielle Bezeichnung, sondern eine allgemein gebrauchte Sammelbezeichnung für aus dem Magen isolierte, bisher nicht kultivierbare, gramnegative, ureasepositive, spiralige, begeißelte Bakterien mit einer Größe von etwa 0,8 x 10 µm. Bei natürlich infizierten Tieren finden sich häufig keinerlei Krankheitsanzeichen bis hin zu milden Gastritiden. Das Vorkommen bei Hauskatzen wird in verschiedenen Studien mit Prozentsätzen zwischen ca. 50% bis beinahe 100% angegeben (Strauss-Ayali et al. 2001, Norris et al. 1999). Bei Schweinen wird eine Infektionsrate von 77% beschrieben (Queiroz et al. 1996). In diesen Studien fehlt durchweg ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der *Helicobacter*infektion und eventuell gefundenen Krankheitssymptomen.

*H. pylori* hat bei Tieren eine zu vernachlässigende Bedeutung als Krankheitserreger. Es existieren einzelne Studien über *H. pylori* positive Rhesusaffen, die an Gastritiden litten (Handt et al. 1997) sowie über Hauskatzen, die mit *H. pylori* infiziert waren (Handt et al. 1995). Der Versuch, *H. pylori* bei streunenden Katzen nachzuweisen, schlug fehl, was



darauf schließen lässt, dass es sich bei *H. pylori*-Infektionen bei Hauskatzen um Anthroponosen handelt (EL-Zaatari et al. 1997).

Neben den beiden *Helicobacterspecies* *H. cetorum* und *H. acinonychis* als Beispiele für Species mit eindeutig pathogener Bedeutung für bestimmte Tierarten gibt es eine Vielzahl an gastrischen und enterohepatischen *Helicobacter*arten, deren pathogene Bedeutung im Tierreich unklar ist. Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, dass ein Großteil der bekannten *Helicobacterspecies* von Tierarten isoliert wurde, die als Laborversuchstiere dienen, wie Rhesusaffen, Nagetiere, Frettchen sowie Hunde und Katzen. Allein etwa zehn verschiedene *Helicobacterspecies* wurden bei kleinen Nagetieren beschrieben. Verschiedene Autoren äußern den Verdacht, dass es sich bei einigen Arten um Normalflora bei der entsprechenden Tierart, insbesondere bei Mäusen und Hamstern, handelt (Shen et al. 1997, Simmons et al. 2000). Über ein natürliches Vorkommen bei wildlebenden Tieren ist dagegen wenig bekannt.

### 1.3 *Helicobacter* in der Humanmedizin

Das gramnegative Bakterium *Helicobacter pylori* spielt in der Humanmedizin seit seiner Entdeckung 1984 durch die australischen Forscher Robin Warren und Barry Marshall eine bedeutende Rolle. Bereits die Entdecker konnten nachweisen, dass *H. pylori* ein Faktor in der Pathogenese von Gastritiden ist. Inzwischen ist *H. pylori* auch als Faktor in der Pathogenese von Ulcera duodeni und ventriculi, des MALT-Lymphoms und des Magenkarzinoms anerkannt (Labenz et al. 1999).

Der Mensch stellt das einzige Reservoir für *Helicobacter pylori* dar, jedoch können verschiedene Tierarten sowohl experimentell als auch auf natürlichem Wege infiziert werden. *H. pylori* ist nach wie vor der wichtigste humanpathogene Vertreter des Genus *Helicobacter*. Weitere *Helicobacterspecies*, die beim Menschen nachgewiesen wurden (Tabelle 1), deren Pathogenität aber fraglich ist, sind zum Beispiel *H. cinaedi*, *H. pullorum* und *H. heilmannii* (Fox 2002).

#### 1.4 Eigenschaften und Wachstumsbedingungen von *H. pylori*

*H. pylori* ist ein gebogenes bis spiralförmiges gramnegatives Stäbchen. Es ist zwischen 3 und 5 µm lang, bei einem Durchmesser von etwa 0,5 µm. Das Bakterium trägt an einem Pol vier bis sechs ummantelte Geißeln. Die Ummantelung ist eine nahtlose Verlängerung der äußeren Zellmembran. Die Geißeln sind ca. 2,5 µm lang und weisen eine terminale Auftreibung auf (Marshall, Warren 1984, Stark et al. 1995).

*H. pylori* ist Urease, Katalase und Oxidase positiv. Mit Hilfe der Urease spaltet *H. pylori* Harnstoff und hebt damit möglicherweise den pH-Wert in seiner Umgebung an. Somit ist er in der Lage sich gegen die schädigenden Einflüsse der Magensäure zu schützen (Stark et al. 1995). Die Katalase- sowie die Ureaseaktivität können mit zunehmender Passagehäufigkeit der Kulturen in vitro nachlassen oder verschwinden (Goodwin, Armstrong, 1990).

Zur Anzucht von *H. pylori* sind komplexe Nährmedien und eine mikroaerobe Atmosphäre mit 10% Kohlendioxid, 5% Sauerstoff und 85% Stickstoff erforderlich. Die Wachstumstemperatur liegt zwischen 30° und 40°C mit einem Optimum bei 37°C. Trotz seiner Fähigkeit, im menschlichen Magen zu überleben und sich anzusiedeln, ist *H. pylori* säuresensibel und wächst in einem neutralen Bereich von pH 6,8 bis pH 7,5 (Stark et al. 1995, Marshall, Warren 1984). Auch unter optimalen Bedingungen ist die Wachstumsgeschwindigkeit gering; auf festen Nährmedien entwickeln sich sichtbare Kolonien erst nach mehreren Tagen.

#### 1.5 Nährmedien zur Isolierung von *H. pylori*

Die erste Isolierung von *Helicobacter pylori* gelang auf Blut- und Schokoladenagar (Marshall et al. 1984). Seitdem wurden viele selektive und nichtselektive Nährmedien zur Isolierung von *H. pylori* aus Magenbiopsien beschrieben und diskutiert. Besonders häufig kommen dabei blutsupplementierte Medien zum Einsatz. Goodwin, Blincow et al. (1985) verwendeten zur Erstisolierung von *H. pylori* aus Magenbiopsien Hirn-Herz-Extrakt-Agar mit 7% Pferdeblut. Sie erzielten hierbei ein dichteres Koloniewachstum bei der Verwendung von Vollblut als bei der Verwendung von lysiertem Blut. Neben Pferdeblut wird auch Schafblut häufig zur Supplementierung von Nährmedien für die Anzucht von *H. pylori* verwendet. Ansorg et al. (1991, 1992) verwendeten Nährböden aus Fleischextrakt-

Peptonagar (CM55, Oxoid) und supplementierten diese mit 5% oder 10% Schafblut. Coudron et al. (1989) testeten das Wachstum von *H. pylori* auf verschiedenen Nährmedien mit unterschiedlichen Konzentrationen von Pferde- und Schafblut und beschrieben die Ergebnisse als vergleichbar. Nachteilig erwies sich hier jedoch die Verwendung von Kochblutagar. In der Literatur sind viele verschiedene Nährmedienrezepte zu finden. Die am häufigsten verwendeten Konzentrationen von Blut in Nährmedien zur Isolierung von *H. pylori* sind 5-10% Schafblut (Ansorg et al. 1991, 1992, Coudron et al. 1989, Piccolomini et al. 1997, Queiroz et al. 1987, Scherer et al. 2003) oder 7-10% Pferdeblut (Coudron et al. 1989, Goodwin, Blincow et al. 1985, Piccolomini et al. 1997, Walsh et al. 1997, Westblom et al. 1991).

Neben blutsupplementierten Nährmedien wurden auch Nährböden mit anderen Zusätzen beschrieben. Verschiedene Autoren beschrieben die erfolgreiche Kultur von *H. pylori* auf dem Grundsubstrat Isosensitest-Agar, ausschließlich supplementiert mit bovinem Serumalbumin (Hazell et al. 1990, Ansorg et al. 1992). Reynolds et al. (1994) entwickelten einen Nährboden mit weitgehend definierten Anteilen und Rindereserumalbuminzusatz, um gezielt physiologische und metabolische Eigenschaften von *H. pylori* untersuchen zu können. Dieses definierte Medium kombinierten Albertson et al. (1998) mit 2% Glukose und 0,5% bovinem Serumalbumin. Coudron et al. (1989) konnten durch die Zugabe von Pferdeserum zu Blutmedien die Größe der gewachsenen Kolonien positiv beeinflussen. Testerman et al. (2001) beschrieben ein Medium zur erfolgreichen Kultur von *H. pylori* ohne Blut- oder Serumzusatz, konnten aber durch die Zugabe von fetalem Kälberserum die Kulturausbeute noch steigern.

Um eine Überwucherung der langsam wachsenden *H. pylori*-Kolonien durch andere Mikroorganismen zu verhindern, werden den meisten Nährböden Antibiotika zugesetzt, die das Wachstum etwaiger Kontaminanten hemmen sollen. Dazu verwendete Wirkstoffkombinationen sind zum Beispiel 6 mg/l Vancomycin, 20 mg/l Nalidixinsäure und 2 mg/l Amphotericin (Goodwin, Blincow et al. 1985, Queiroz et al. 1987) oder 3 mg/l Vancomycin, 10 mg/l Nalidixinsäure und 5 mg/l Trimethoprim (Goodwin, McCulloch et al. 1985) oder 5 mg/l Amphotericin, 5 mg/l Cefsulodin, 5 mg/l Teicoplanin und 10 mg/l Trimethoprim (Olivieri et al. 1993). Degnan et al. (2003) entwickelten einen komplexen selektiven Nährboden zur Isolierung von *H. pylori* aus kontaminierten Wasserproben. Mit einer Kombination von 3500 IU/l Polymyxin B, 17,5 mg/l Amphotericin B, 10 mg/l

Vancomycin, 5 mg/l Trimethoprim und 5 mg/l Cefsulodin gelang es ihnen, das Wachstum der Bakterien in den Wasserproben auf *Helicobacter* zu reduzieren.

Insgesamt werden die Erfolgsquoten der einzelnen Nährmedien in der Literatur widersprüchlich beschrieben und es wurde hinsichtlich Wachstumsgeschwindigkeit und Erntemenge noch kein idealer Nährboden gefunden.

Obwohl bei gastroenterologischen Untersuchungen zur Diagnose einer *H. pylori*-Infektion meistens auf den kulturellen Nachweis des Erregers in Magenschleimhautbiopsien verzichtet wird und stattdessen nichtinvasive Verfahren – wie Antikörpernachweis im Serum, Antigennachweis im Stuhl, C<sup>13</sup>-Harnstoff-Atemtest – eingesetzt werden, behält die Kultur auf Nährböden mit ansteigender Häufigkeit von Antibiotikaresistenzen von *H. pylori* weiterhin ihre Bedeutung. Die routinemäßige kulturelle Untersuchung von Magenbiopsien auf *H. pylori* wird inzwischen wieder angeraten (Versalovic et al. 2003).

## 1.6 Morphologie von *H. pylori*

Bereits in den ersten Untersuchungen von *H. pylori* 1984 durch Warren und Marshall wurden verschiedene Zellformen beschrieben. Auf Nährmedien gezüchtete *H. pylori*-Zellen sind kleiner und weniger gewunden als die in den Originalausstrichen spiraligen bis gebogenen Zellen. In älteren Kulturen bildet *H. pylori* runde Zellformen (Marshall et al. 1984). Sowohl die Ursache der geringeren Windung von *H. pylori* in vitro im Gegensatz zu der spiraligen Form in vivo als auch die Bedeutung der Rundformen und ihre Entstehung konnte bis heute nicht abschließend geklärt werden und wird widersprüchlich diskutiert. Chan et al. (1994) beschrieben das Vorkommen von Rundformen von *H. pylori* im menschlichen Magen.

In vitro wurde die Umwandlung von stäbchenförmigen *H. pylori*-Zellen über U- oder Bogenformen zu nicht mehr subkultivierbaren Rundformen ab dem zweiten bis dritten Kulturtag beschrieben (Catrenich et al. 1991, Sörberg et al. 1996, Benaissa et al. 1996). Bode et al. (1993) induzierten die Rundformbildung von verschiedenen *H. pylori*-Stämmen in vitro mit Bismutsubcitrat, Bismutsubsalcylat, Erythromycin und Amoxicillin. Die entstandenen flagellentragenden runden Zellen hatten einen Durchmesser von 0,8 bis 1,0 µm und wiesen eine komplette Ultrastruktur auf. Die Amoxicillin ausgesetzten Zellen

waren nur 0,3 µm groß. Die entstandenen Rundformen waren lebensfähig. Hier erwogen die Autoren die Möglichkeit, dass die Rundformen eine Art Dauerform darstellen, im Gegensatz zur vegetativen Stäbchenform. Eine Induzierung der Rundformbildung durch ungünstige äußere Kulturbedingungen beschrieben Kusters et al. (1997). Ihre Kulturen rissen unter den verschiedenen Bedingungen ab, bevor die Hälfte der Zellen sich zu Rundformen umgebildet hatte. Nach Meinung der Autoren stellt die Rundform der *H. pylori*-Zellen die abgestorbene und nicht revitalisierbare Form dar. Die Umwandlung sahen sie nicht als aktiven Prozess an. Cole et al. (1999) beschrieben die induzierte Wandlung von Spiralen in nichtkultivierbare, aber lebensfähige Rundformen durch Stickstoffoxid. Im Gegensatz dazu gelang es einer Forschungsgruppe aus reinen Rundformkulturen Spiralen und Bogenformen zu kultivieren (Andersen et al. 1997). Auch eine weitere Gruppe schließt aus ihren Ergebnissen, dass Rundformkulturen „wiederbelebt“ werden können (Yamaguchi et al. 1999). Eine Gruppe italienischer Forscher beschrieb eine erfolgreiche Infektion von Mäusen mit coccoiden Kulturen von *H. pylori*, die sich in vivo in Stäbchen wandelten (Cellini et al. 1994). Neue morphologische Erkenntnisse brachte die Beschreibung von zwei verschiedenen Typen von Rundformen, die sich durch eine rauhe bzw. glatte Oberfläche, ihren Entstehungsprozess und ihre Kultivierbarkeit unterscheiden. Es wird vermutet, dass Rundformen in *H. pylori*-Kulturen generell eine Mischung aus lebenden, aber nicht kultivierbaren, abgestorbenen sowie lebenden kultivierbaren Organismen darstellen (Saito et al. 2003, Sato et al. 2003). Den meisten Studien gemeinsam ist die Beobachtung, dass der Anteil der Rundformen mit zunehmendem Kulturalter ansteigt (Warren, Marshall 1984, Bode et al. 1993, Cellini et al. 1994, Yamaguchi et al. 1999, Sato et al. 2003).

### 1.7 Fettsäuremuster von *H. pylori*

Das längerkettige Fettsäuremuster von Bakterien setzt sich aus gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit einer Kettenlänge zwischen etwa 10 und 20 C-Atomen zusammen. Zum größten Teil handelt es sich um gebundene Fettsäuren, die in unterschiedlichen Membranstrukturen und -bestandteilen wie der Zytoplasmamembran, der äußeren Membran, dem Lipopolysaccharid, in Einschlusskörperchen und intrazytoplasmatischen Membranen zu finden sind. Eingebunden in Membranstrukturen beeinflussen an Phospholipide gebundene Fettsäuren die Fluidität und damit die Permeabilität der Membranen (Geis et al. 1990, Ratledge et al. 1988).

Die Analyse des Fettsäuremusters dient in der Mikrobiologie unter anderem taxonomischen Zwecken. Die meisten gramnegativen Bakterien enthalten Hexadecansäure (16:0) als Hauptfettsäure und in kleineren Anteilen Myristinsäure (14:0) und Stearinsäure (18:0). An ungesättigten Fettsäuren werden hauptsächlich cis-9-Hexadecansäure (16:0  $\omega$ 7c) und cis-11-Octadecansäure (18:1  $\omega$ 7c) gefunden. Fettsäuren, die ausschließlich bei Bakterien gefunden werden, sind Cyclopropansäuren,  $\beta$ -Hydroxy-Säuren und verzweigtkettige Fettsäuren (Lechevalier et al. 1988).

Meist wird zu taxonomischen Zwecken das gesamtzelluläre Fettsäuremuster mittels Gaschromatographie bestimmt (Steinbrueckner et al. 1998, On 1996). Zu den regelmäßig von verschiedenen Autoren bei *H. pylori* gefundenen Fettsäuren zählen Myristinsäure (14:0), Palmitinsäure (16:0), 3-Hydroxypalmitinsäure (16:0 3OH), Stearinsäure (18:0), 3-Hydroxystearinsäure (18:0 3OH), Octadecansäure (18:1) und Methylenoctadecansäure (19:0 cyclo) (Goodwin, McCulloch et al. 1985, Lambert et al. 1987, Geis et al. 1990, Scherer et al. 2003). Mit seinen hohen Anteilen an Myristinsäure (14:0) und Methylenoctadecansäure (19:0 cyclo) bildet das gesamtzelluläre Fettsäuremuster von *H. pylori* eine Besonderheit unter den Bakterien (Wilkinson 1988).

Auf eine Vielzahl vor allem grampositiver Bakterien haben Fettsäuren nachgewiesenermaßen eine toxische Wirkung (Knapp et al. 1986). Für *H. pylori* ist eine Empfindlichkeit gegenüber einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere Ölsäure, Linolsäure und Arachidonsäure, beschrieben worden (Hazell et al. 1990, Khulusi et al. 1995, Thompson et al. 1994). In unterschiedlichen Versuchen konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* toxische Fettsäuren in seine Phospholipide einbaut (Khulusi et al. 1995), aber auch selbst in seinem Fettsäuremuster Ölsäure und Linolsäure zu enthalten scheint (Geis et al. 1990, Goodwin, McCulloch et al. 1985, Wilkinson 1988).

Scherer et al. (2003) beschrieben einen Einfluss eines unterschiedlichen Fettsäuregehaltes im Nährmedium auf das Fettsäuremuster von *H. pylori*. Sie fanden, dass verschiedene *H. pylori*-Stämme Fettsäuren, speziell Palmitinsäure (16:0), Stearinsäure (18:0) und Ölsäure (18:1  $\omega$ 9c), aus schafblutsupplementierten Nährböden aufnehmen und nach der Kultur im eigenen Fettsäuremuster aufweisen. Nach Kultur auf fettsäurefreiem Agar fehlten diese Fettsäuren im Fettsäuremuster von *H. pylori* oder kamen zu geringeren Anteilen vor.

## 2 Fragestellung

1. *Helicobacter pylori* ist ein anspruchsvoller, schwer anzüchtbarer Keim, dessen Kulturen in vitro häufig aus ungeklärter Ursache abreißen. Meist werden zur Kultur von *H. pylori* bluthaltige Medien verwendet. Ansorg et al. (1991) zeigten in Untersuchungen auf 10%-Schafblutagar, dass 50% der verwendeten *H. pylori*-Isolate nach fünf bis sechs Passagen nicht mehr subkultivierbar waren. In späteren Studien mit 5%-Schafblutagar konnten diese Befunde nicht bestätigt werden (Scherer et al. 2003). Über eine optimale Konzentration an Blut als Nährbodensupplement ist bisher nichts bekannt. Neben bluthaltigen Nährmedien werden auch blutfreie Nährmedien zur Kultur von *H. pylori* verwendet, z.B. Isosensitest-Agar, versetzt mit 0,1% Rinderalbumin (Ansorg et al. 1992, Reynolds et al. 1994). Über eine optimale Konzentration von Albumin als Nährbodensupplement ist ebenfalls nichts bekannt. In den vorliegenden Untersuchungen wird deshalb der Einfluss steigender Blutkonzentrationen und steigender Albuminkonzentrationen im Nährmedium auf das Wachstum von *H. pylori* hinsichtlich Wachstumsgeschwindigkeit und Kulturausbeute untersucht.

2. Das Fettsäuremuster von *H. pylori* ist ein taxonomisch wichtiges Merkmal, das auch zur Identifizierung unbekannter Isolate verwendet wird (Steinbrueckner et al. 1998). Entsprechende Untersuchungen werden vorwiegend nach Kultur auf bluthaltigen Nährmedien durchgeführt, die Ergebnisse variieren beträchtlich (Scherer et al. 2003). Deshalb wird untersucht, ob sich die Fettsäuremuster von *H. pylori* nach Kultur auf bluthaltigen gegenüber albuminhaltigen Nährmedien unterscheiden und ob steigende Blutkonzentrationen, steigende Albuminkonzentrationen im Nährmedium oder die Dauer der Inkubation Einfluss auf das Fettsäuremuster von *H. pylori* nehmen.

3. Ein Merkmal von *H. pylori* ist die Ausbildung von Rundformen mit zunehmendem Kulturalter sowie unter ungünstigen Kulturbedingungen. Es kommen sowohl in vivo als auch in vitro spiral- bis stäbchenförmige, bogenförmige und runde Zellen vor. Die Rundformen werden einerseits als eine Art Dauerform (Bode et al. 1993), andererseits als degenerierte und absterbende Zellen angesehen (Kusters et al. 1997). Zu untersuchen ist deshalb, welchen Einfluss eine zunehmende Inkubationszeit auf bluthaltigen und albuminhaltigen Nährmedien bei sonst gleichen Kulturbedingungen auf die Zellmorphologie von *H. pylori* hat, und ob sich die Zellmorphologie nach Kultur auf den verschiedenen Nährmedien unterscheidet.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 *H. pylori*-Stämme

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit drei Typstämmen und drei Patientenstämmen von *Helicobacter pylori* durchgeführt: ATCC 43504, ATCC 700392, ATCC 51932, IMMi 576, IMMi 583 und IMMi 589. Die Stämme mit der Abkürzung IMMi sind Isolate aus Magenbiopsien von Patienten der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie des Zentrums für Innere Medizin des Universitätsklinikum Essen. Diese Stämme wurden bis zu ihrer Verwendung in der vorliegenden Studie nur wenige Male auf Nährmedien passagiert und werden hier als frischisolierte Stämme bezeichnet. Die ATCC-Stämme entstammen der American Type Culture Collection (Atlanta, Georgia, USA). Sie werden seit Jahren kultiviert und werden hier als laboradaptierte Stämme bezeichnet. Alle Stämme wurden der Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikum Essen entnommen, wo sie in 10%igem Schweinemucin suspendiert und bei -70°C eingefroren aufbewahrt werden.

Um eine ausreichende Menge Bakterienmaterial zu erhalten und um für alle Versuche möglichst gleich alte Bakterienkulturen zu verwenden, wurden die der Stammsammlung entnommenen tiefgefrorenen Suspensionen der sechs ausgewählten *H. pylori*-Stämme auf Isosensitest-0,5%-Albuminagar-Platten rekultiviert. Die beimpften Platten wurden vier bis sechs Tage bei 37°C in einer mikroaeroben Atmosphäre aus 8-10% Kohlendioxid, 5-7% Sauerstoff, 83-87% Stickstoff und einer Luftfeuchtigkeit von ca. 90% im Brutschrank inkubiert. In zwei- bis fünftägigen Abständen wurde ein Teil jeder Kultur auf Isosensitest-0,5%-Albuminagar-Platten überimpft und weiter kultiviert, der Rest wurde portionsweise in 10%-iges Schweinemucin suspendiert und bei -20°C eingefroren. Dieses Verfahren wurde weitergeführt, bis von jedem Stamm etwa 15 Einzelportionen eingefroren waren. Die Kulturen wurden regelmäßig hinsichtlich ihrer Identität als *H. pylori* mit folgenden Methoden überprüft: typische Koloniemorphologie, Oxidase-, Urease- und Katalase-Reaktion und Bestimmung des Fettsäuremusters mittels Gaschromatographie.

Für die folgenden Versuche wurden die so vermehrten Kulturen portionsweise aufgetaut, auf Isosensitest-0,5%-Albuminagar-Platten aufgebracht und bebrütet. Bevor aufgetaute Kulturen in Versuchen eingesetzt wurden, durchliefen sie mindestens zwei Passagen von



vier Tagen auf Isosensitest-0,5%-Albuminagar, um mucinfrei zu werden. Alle Versuche starteten mit jeweils vier Tage alten Kolonien.

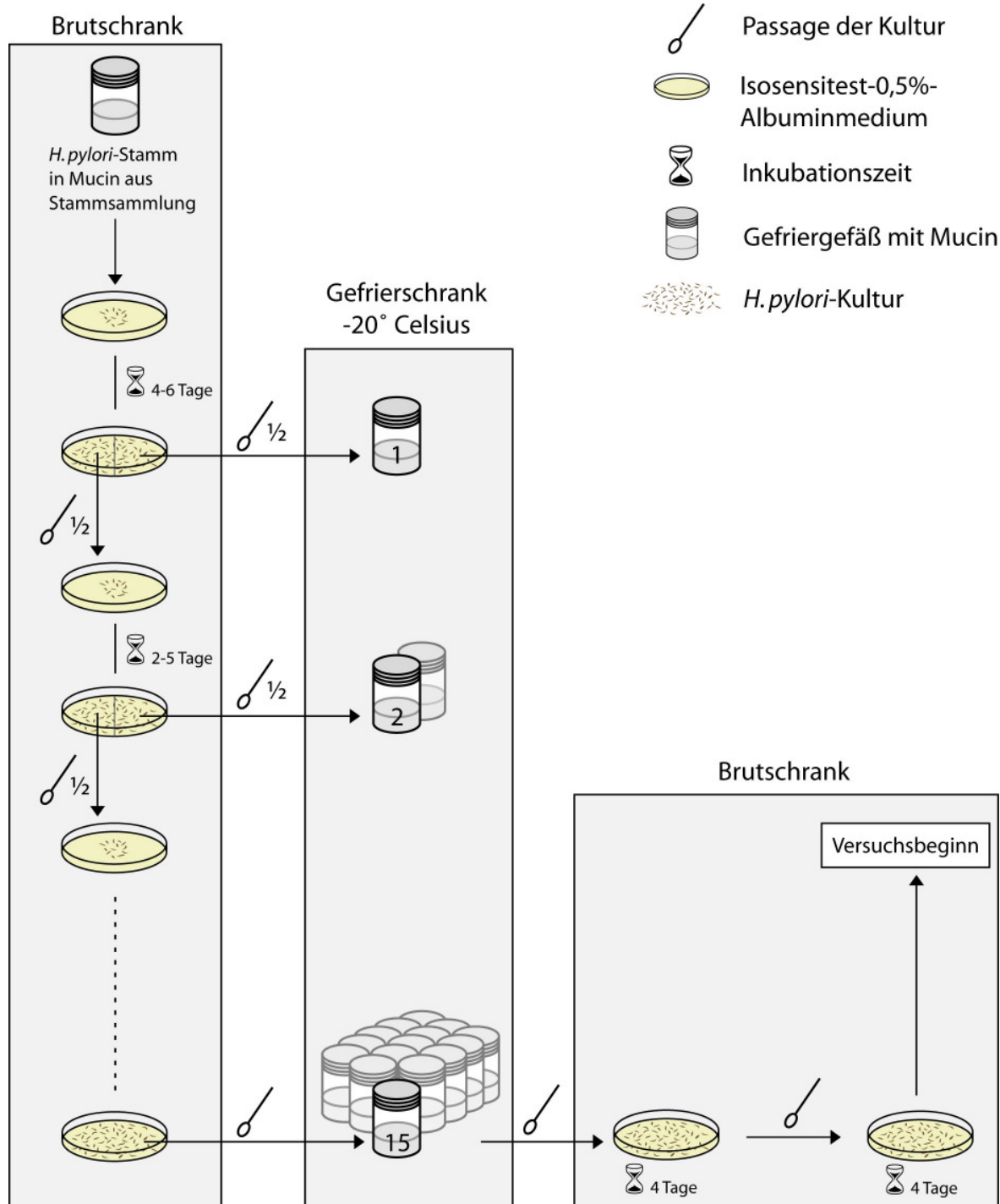


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Behandlung aller *H. pylori*-Kulturen von der Entnahme aus der Stammsammlung bis zum Versuchsbeginn.

### 3.2 Nährmedien

Es wurden die zwei verschiedenen Nährboden-Grundsubstrate Isosensitest-Agar und Fleischextrakt-Pepton-Agar verwendet. Diese wurden zum einen mit Blut in fünf verschiedenen Konzentrationen, zum anderen mit Albumin in fünf verschiedenen Konzentrationen supplementiert. Zusätzlich wurden beide Grundsubstrate ohne Zusätze als Nährboden verwendet. Daraus ergaben sich insgesamt 22 verschiedene Nährmedien.

#### 3.2.1 Grundsubstrate

Fettsäurefreier **Isosensitest-Agar** (CM 471, Oxoid, Basingstoke, England) mit folgender Zusammensetzung:

Casein-Hydrolysat	11 g/l
Pepton	3 g/l
Glucose	2 g/l
Agar	8 g/l

weitere definierte Anteile: Stärke, Natriumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat, Natriumacetat, Magnesiumglycerophosphat, Calciumgluconat, Kobalt(II)-Sulfat, Kupfer(II)-Sulfat, Zinksulfat, Eisen(II)-Sulfat, Mangan(II)-Chlorid, Menadion, Cyanocobalamin, L-Cystein, L-Tryptophan, Pyridoxin, Panthotenat, Nicotinamid, Biotin, Thiamin, Adenin, Guanin, Xanthin, Uracil

**Fleischextrakt-Pepton-Agar** (CM 55, Oxoid) mit der Zusammensetzung:

Fleischextrakt ‚Lab-Lemco‘	10 g/l
Pepton	10 g/l
Natriumchlorid	5 g/l
Agar	15 g/l

### 3.2.2 Nährmedienzubereitungen

#### **Isosensitest-Agar mit Albumin (IsoA)**

31,4 g des Grundsubstrates wurden in 900 ml demineralisiertem Wasser vollständig gelöst und für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden zunächst 5 mg/l Amphotericin B (Apothecon, Geneva Pharmaceuticals, Inc. Dayton, NJ 08810 USA) und 6 mg/l Vancomycin (Lilly Deutschland GmbH, Giessen) zugegeben und vermischt. Dann wurden die in jeweils 100 ml demineralisierten Wassers gelösten und sterilfiltrierten Portionen fettfreien Rinderserumalbumins (Albumin Bovine, fettfrei A 6003, Sigma, St.Louis, Missouri, USA) nach folgendem Schema in steigender Konzentration beigemischt.

für 0,05 %ig-----	0,5 g Albumin
für 0,1 %ig-----	1,0 g Albumin
für 0,25 %ig-----	2,5 g Albumin
für 0,5 %ig-----	5,0 g Albumin
für 1,0 %ig-----	10,0 g Albumin

Je 15 ml Agar wurden in Petrischalen von 9,5 cm Durchmesser gegossen.

#### **Isosensitest-Agar mit Schafblut (IsoB)**

31,4 g des Grundsubstrates wurden in 1000 ml demineralisiertem Wasser vollständig gelöst und für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden zunächst 5 mg/l Amphotericin B und 6 mg/l Vancomycin zugegeben und vermischt. Dann wurde Schafblut (FSR 1055, Oxoid) nach unten aufgeführtem Schema in steigender Konzentration beigemischt.

für 1,0 %ig-----	10ml Schafblut
für 2,5 %ig-----	25ml Schafblut
für 5,0 %ig-----	50ml Schafblut
für 7,5 %ig-----	75ml Schafblut
für 10,0 %ig-----	100ml Schafblut

Je 15 ml Agar wurden in Petrischalen von 9,5 cm Durchmesser gegossen.

**Fleischextrakt-Pepton-Agar mit Albumin (CM55A)**

40 g des Grundsubstrates wurden in 900 ml demineralisiertem Wasser homogen suspendiert und für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden zunächst 5 mg/l Amphotericin B und 6 mg/l Vancomycin zugegeben und vermischt. Dann wurden die in jeweils 100 ml demineralisierten Wassers gelösten und sterilfiltrierten Portionen fettfreien Rinderserumalbumins (Albumin Bovine, fettfrei A 6003, Sigma, St.Louis, Missouri, USA) nach unten aufgeführtem Schema in steigender Konzentration beigemischt.

für 0,05 %ig-----0,5 g Albumin

für 0,1 %ig-----1,0 g Albumin

für 0,25 %ig-----2,5 g Albumin

für 0,5 %ig-----5,0 g Albumin

für 1,0 %ig-----10,0 g Albumin

Je 15 ml Agar wurden in Petrischalen von 9,5 cm Durchmesser gegossen.

**Fleischextrakt-Pepton-Agar mit Schafblut (CM55B)**

40 g des Grundsubstrates wurden in 1000 ml demineralisiertem Wasser vollständig gelöst und für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden zunächst 5 mg/l Amphotericin B und 6 mg/l Vancomycin zugegeben und vermischt. Dann wurde Schafblut nach unten aufgeführtem Schema in steigender Konzentration beigemischt.

für 1,0 %ig-----10ml Schafblut

für 2,5 %ig-----25ml Schafblut

für 5,0 %ig-----50ml Schafblut

für 7,5 %ig-----75ml Schafblut

für 10,0 %ig-----100ml Schafblut

Je 15 ml Agar wurden in Petrischalen von 9,5 cm Durchmesser gegossen.

**Isosensitest-Agar ohne Zusatz (Iso pur)**

31,4 g Isosensitest-Agar wurden in 1000 ml demineralisiertem Wasser vollständig gelöst und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden 5 mg/l Amphotericin B und 6 mg/l Vancomycin zugegeben und vermischt.

Je 15 ml Agar wurden in Petrischalen von 9,5 cm Durchmesser gegossen.

**Fleischextrakt-Pepton-Agar ohne Zusatz (CM55 pur)**

40 g Fleischextrakt-Pepton-Agar wurden in 1000 ml demineralisiertem Wasser vollständig gelöst und 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurden 5 mg/l Amphotericin B und 6 mg/l Vancomycin zugegeben und vermischt.

Je 15 ml Agar wurden in Petrischalen von 9,5 cm Durchmesser gegossen.

Die frisch gegossenen Platten wurden für eine Nacht im Brutschrank bei 37°C getrocknet. Alle Nährmedien wurden bis zur Verwendung maximal fünf Tage bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

### 3.3 Reagenzien und Geräte

Reagenzien zur Gaschromatographie	Hersteller
Reagenz 1 (45 g Natriumhydroxid, 150 ml Methanol, 150 ml destilliertes Wasser)	Merck KGaA, Darmstadt
Reagenz 2 (325 ml 6 normale Salzsäure, 275 ml Methanol)	
Reagenz 3 (200 ml Hexan, 200 ml Buthylmethylether)	
Reagenz 4 (10,8 g Natriumhydroxid, 900 ml destilliertes Wasser)	
Wasserstoff mit 99,999%iger Reinheit	Air Liquide Deutschland GmbH
trockene synthetische Luft, frei von Kohlenwasserstoffen	
Stickstoff mit 99,999%iger Reinheit	

Geräte zur Gaschromatographie	Hersteller
Gaschromatograph 5890A	Hewlett Packard, Avondale, PA, USA
automatisches Probeneinführgerät mit integriertem Split/Splitless-Injektor, Typ 7673A	Hewlett Packard, Avondale, PA, USA
Kapillarsäule SE 54 Ultra 2	Hewlett Packard, Avondale, PA, USA
Reagenzgläser mit teflonbeschichteten Schraubverschlüssen	Duran, Schott, Mainz
Reagenzglasschüttler Vortex Genie 2	Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz
Überkopfschüttler Reax 2	Heidolph, Schwabach
Injektionsfläschchen mit teflonbeschichteten Schraubverschlüssen	Hewlett Packard, Avondale, PA, USA
Reagenzglaszentrifuge, Labofuge A	Heraeus-Christ, Düsseldorf
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Reagenzien zur Kultivierung, zur Färbung und zur biochemischen Identifizierung von <i>H. pylori</i>	Hersteller
Phosphatpuffer pH 7,4 Zusammensetzung: ▪ 810 ml Dinatriumhydrogenphosphat-Lsg., aus: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 11,88g Aqua dem.                    1000 ml ▪ 190 ml Kaliumhydrogenphosphat- Lsg., aus: $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 9,08 g Aqua dest.                    1000 ml ▪ 8,5 g Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
10%iges Schweinemucin M1778	Sigma St Louis, Missouri, USA
Fuchsinrot, aus:	
Fuchsinkonzentrat Alk.                    100 ml	Merck KGaA, Darmstadt
Phenol 90%                                    45 ml	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Aqua dest.                                    855 ml	
Aqua ad injectabilia	Braun AG, Melsungen
Bactident-Oxidase-Teststreifen	Merck KGaA, Darmstadt
Harnstoff-Reagenz 10%, aus: kristalliner Harnstoff                    4,0 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100mM                    4,0 ml (1,36 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ in 100 ml Aqua. dest.) Phenolrotlösung 1%                    0,4 ml Aqua dest.                                    ad 40 ml	Merck KGaA, Darmstadt
9%-Wasserstoffperoxidlösung in A. dest. als Katalase-Reagenz	Merck KGaA, Darmstadt

<b>Geräte zur Kultivierung, zur Färbung und zur biochemischen Identifizierung von <i>H. pylori</i></b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank Cytoperm	Heraeus-Christ, Düsseldorf
Vitek spezial DR 100 Colorimeter	Hach Company, Loveland, Colo., USA
Centrifuge 5415 C	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Eppendorfgefäße 1,5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Plastikreagenzröhrchen 5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Impfeschlingen 1 µl und 10 µl	Greiner Bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Petrischalen mit Nocken, Ø 9,5 cm; Nr.633151	Greiner & Söhne GmbH und Co KG, Nürtingen
Lichtmikroskop Standard 25	Carl Zeiss, Deutschland
Objektträger	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Färbebank	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim
Zählkammer nach Thoma	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim
Trockenblock	Schleicher und Schuell, Dassel



### 3.4 Methoden

#### 3.4.1 Färbemethode

Zur Betrachtung von Bakterien unter dem Lichtmikroskop wurden Objektträgerausstriche angefertigt. Dazu wurde je ein Tropfen Aqua ad injectabilia auf einen Objektträger gebracht. In den Wassertropfen wurden mit einer 1µl-Impfschlinge kleine Mengen Bakterienmasse verrieben und über den Objektträger verteilt. Die Präparate wurden luftgetrocknet und hitzefixiert. Zur Färbung wurde Fuchsinrot auf die getrockneten und abgekühlten Präparate aufgetropft und nach zwei Minuten mit Wasser abgespült. Die Präparate wurden in einem Trockenblock getrocknet.

#### 3.4.2 Bestimmung des Fettsäuremusters von *H. pylori* mittels Flüssiggaschromatographie

Um das gesamtzelluläre Fettsäuremuster von *H. pylori* mittels Flüssiggaschromatographie bestimmen zu können, müssen die gesamten freien und gebundenen Fettsäuren der Bakterienzellen extrahiert und zu Fettsäuremethylestern verestert werden. Diese wurden aus den jeweiligen Bakterienproben im folgenden, vom Hersteller beschriebenen Aufbereitungsverfahren in vier Schritten gewonnen. Für die genaue Zusammensetzung der Reagenzien siehe 3.3.

Schritt 1, Verseifungsreaktion: Von der jeweiligen Bakterienprobe wurden maximal 100 µl in ein verschraubbares Reagenzröhrchen gegeben und mit 1 ml methanolhaltiger, hochkonzentrierter Natronlauge (Reagenz 1) versetzt. Das fest verschlossene Reagenzröhrchen wurde für fünf Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt, danach kurz vermischt (Vortex) und sofort für weitere 25 Minuten in das siedende Wasserbad gestellt. In diesem ersten Schritt werden die Fettsäuren aus dem Lipidverband gelöst.

Schritt 2, Methylierungsreaktion: Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden dem Reagenzglasinhalt 2 ml methanolhaltige Salzsäure (Reagenz 2) hinzugefügt. Durch die Senkung des pH-Wertes unter 1,5 wird die Methylierung der Fettsäuren ermöglicht. Dann wurde die Lösung in ein 80°C warmes Wasserbad gestellt. Nach 10 Minuten wurde das Reagenzglas sofort mit Wasser abgekühlt.

Schritt 3, Extraktionsvorgang: Es wurden 1,25 ml eines Lösungsmittels aus einer Etherkomponente und Hexan (Reagenz 3) zugegeben. Darin lösen sich die schlecht wasserlöslichen, methylierten Fettsäuren. Zur besseren Löslichkeit wurden die Phasen 10 Minuten in einem Überkopfschüttler vermischt. Im Anschluss wurden die Phasen durch Zentrifugation (5 min, 5000 U/min) wieder voneinander getrennt. Die Fettsäuremethylester befanden sich nun in der oberen Lösungsmittelphase.

Schritt 4, Reinigung: Zur abschließenden Reinigung der fettsäuremethylhaltigen Lösungsmittelphase wurde diese in ein frisches verschraubbares Reagenzglas pipettiert und mit 4 ml der wässrigen Lösung Reagenz 4 versetzt. Als Waschvorgang erfolgte eine erneute Phasendurchmischung für fünf Minuten im Überkopfschüttler. Im Anschluss wurden die Phasen durch Zentrifugation voneinander getrennt. Die nun gereinigte Lösungsmittelphase wurde in Injektionsfläschchen mit teflonbeschichteten Schraubverschlüssen pipettiert.

Zur Fettsäureanalytik wurde ein 5890 series II plus Gaschromatograph der Firma Hewlett Packard verwendet, der mit einem automatischen Probeneinführgerät (Typ 7673 A) mit integriertem Splitinjektor (6890 series) der Firma Hewlett Packard, einer 25 m × 0,2 mm Kapillarsäule mit Methyl-Phenyl-Silikon als stationärer Phase mit einer Filmdicke von 0,33 µm (SE 54 Ultra 2) sowie einem Flammenionisationsdetektor und der Hewlett Packard 3365 ChemStation-Software Version 3.34 ausgestattet ist.

Die Lösungen mit den zu analysierenden Fettsäuremethylestern in den Injektionsfläschchen werden mittels des automatischen Einführgerätes in den 250°C heißen Injektor gegeben. Das Temperaturprogramm zur Aufheizung der Trennsäule wird nach einer zweiminütigen isothermen Phase von 170°C gestartet. Mit einer Aufheizgeschwindigkeit von 5°/min steigt die Temperatur von 170°C auf 260°C. Zur Reinigung der Säule von Probenresten wird die Säule mit 40°/min bis 310°C aufgeheizt. Diese Temperatur wird für 4 min konstant gehalten. Die Analysezeit beträgt insgesamt etwa 25 Minuten, wobei alle Fettsäuren mit einer Retentionszeit bis zu 19 Minuten registriert werden. Trägergas ist Wasserstoff, Stickstoff dient als Make-up-Gas und synthetische Luft zur Unterhaltung der Detektorflamme.

Das Sherlock-Mikroben-Identifikations-System (MIS) benutzt eine externe Kalibrationsmischung zur Eigenkontrolle und zur Peakbenennung, die es in regelmäßigen Abständen zwischen den einzelnen Probenläufen neu analysiert. Diese Standardmischung enthält unverzweigte gesättigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von neun bis 20 Kohlenstoffatomen sowie fünf Hydroxyfettsäuren. Abbildung 6 (siehe Anhang) zeigt das Gaschromatogramm dieser Kalibrationsmischung. Alle Komponenten sind in bestimmten Mengen enthalten, so dass die Software bei jeder Kalibrationsmessung die Arbeit des Gaschromatographen kontrollieren kann. Die Hydroxykomponenten sind sowohl gegenüber Druck- und Temperaturschwankungen als auch gegenüber Kontaminationen des Injektionseingangs empfindlich und dienen somit zur Qualitätskontrolle. Die Peakbenennung erfolgt über die Berechnung der äquivalenten Kettenlänge (ECL=equivalent chain length). Diese ergibt sich aus der Retentionszeit der unbekannten Fettsäure im Verhältnis zu den bekannten Retentionszeiten der in der Kalibrationsmischung enthaltenen, unverzweigten gesättigten Fettsäuren nach folgender Formel:

$$ECL_x = \frac{R_{tx} - R_m}{R_{t(n+1)} - R_m} + n$$

Dabei ist  $R_{tx}$  die Retentionszeit der unbekannten Fettsäure x,  $R_{tn}$  die Retentionszeit der gesättigten Fettsäure vor x und  $R_{t(n+1)}$  die Retentionszeit der gesättigten Fettsäure nach x. n ist die Kettenlänge der vor x ausgewaschenen Fettsäure. So ist es möglich, jede Äquivalentkettenlänge auszurechnen und einem Peaknamen zuzuordnen. Nach Peakbenennung einer unbekannten Probe vergleicht das MIS die ermittelten äquivalenten Kettenlängen mit den in den Peaktabellen gespeicherten, theoretisch perfekten äquivalenten Kettenlängen und kann neu auskalibrieren, falls wesentliche Abweichungen auftreten sollten. Auf diese Weise ist eine Vergleichbarkeit von Chromatogrammanalysen von verschiedenen Probenläufen gewährleistet (Sasser, Myron, 1990).

### 3.4.3 Bestimmung des Fettsäuremusters in unbeimpften Nährmedien mittels Flüssiggaschromatographie

Um zu untersuchen, ob und welche Fettsäuren in den verwendeten Nährmedien enthalten sind, wurde aus unbeimpften Nährmedien mit den Zusammensetzungen CM55-pur, CM55-1%-Albumin und CM55-10%-Blut, sowie Isosensitest-pur, Isosensitest-1%-Albumin und Isosensitest-10%-Blut jeweils ein etwa 0,5 x 4 cm großer Streifen ausgeschnitten und in 1 ml methanolhaltige, hochkonzentrierte Natronlauge (Reagenz 1) gegeben. Die weitere Verarbeitung und die Bestimmung der Fettsäuren erfolgten nach der oben beschriebenen Methode zur Bestimmung des gesamtzellulären Fettsäuremusters von *H. pylori* (3.4.2). Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt, die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus beiden Versuchen dar.

### 3.4.4 Herstellung von *H. pylori*-Suspensionen mit dem Trübungsstandard McFarland Nr. 3

Um vergleichbare Einsaaten der *H. pylori*-Kulturen auf den verschiedenen Nährmedien zu erreichen, wurde in allen Versuchen mit dem Trübungsstandard McFarland Nr. 3 gearbeitet.

Zur Herstellung von *H. pylori*-Suspensionen mit dem Trübungsstandard McFarland Nr. 3 wurde mit einer 1 µl-Öse eine geringe Menge Bakterienmasse von der Platte abgenommen und in Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4) eingerieben. Diese Suspensionen wurden mit Hilfe des Vitek-Colorimeters auf den Trübungsstandard McFarland Nr. 3 eingestellt.

Zum Vergleich der Trübung der Suspension mit der Keimkonzentration wurde von jedem Stamm am vierten Tag der Kultur auf Isosensitest-0,5%-Albuminagar eine Suspension von Bakterien in Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4) mit dem Trübungsstandard McFarland Nr. 3 hergestellt. Diese Suspensionen wurden 1 : 10 mit Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4) verdünnt. Jeweils ein Milliliter der verdünnten Suspensionen wurde mit 20 µl Fuchsinrot vermischt. Mit den gefärbten Suspensionen wurde eine Thoma-Zählkammer beschickt. Unter dem Lichtmikroskop wurden jeweils in zwei verschiedenen Großquadraten sieben Kleinquadrate des Zählgitters ausgezählt.

Die Kammertiefe, also die Entfernung vom Boden der Zählkammer bis zur Unterseite des Deckgläschens beträgt 0,1 mm. Die Fläche eines Kleinquadrates beträgt 0,0025 mm<sup>2</sup>. Ein Großquadrat besteht aus 16 Kleinquadraten und hat somit eine Fläche von 16 x 0,0025 mm<sup>2</sup> = 0,04 mm<sup>2</sup>. Das Volumen über einem Großquadrat beträgt demnach 0,1 mm x 0,04 mm<sup>2</sup> = 0,004 mm<sup>3</sup> bzw. 0,004 µl.

0,004 µl sind der 250.000ste Teil von 1000 µl, also eines Milliliters. Um die Zellzahl in einem Milliliter einer Bakteriensuspension mit dem Trübungsstandard McFarland Nr. 3 zu berechnen, wurden von der 1 : 10 verdünnten Suspension sieben Kleinquadrate ausgezählt. Der Mittelwert dieser Zellzahl wurde mit 16 multipliziert, um auf die Zellzahl pro Großquadrat zu kommen. Das Ergebnis wurde mit 250.000 multipliziert. So erhielt man die Anzahl der Zellen pro Milliliter verdünnter Suspension. Diese Zahl mit 10 multipliziert ergibt schließlich die Anzahl an Zellen in einem Milliliter Mc Farland Nr. 3 Suspension.

Die Zellzählung von Bakteriensuspensionen der verschiedenen *Helicobacter pylori*-Stämme in Phosphatpuffer mit dem Trübungsstandard McFarland Nr. 3 ergab nach zwei Zählungen durchschnittlich folgende Werte:

ATCC 43504:	7,2 x 10 <sup>8</sup> Zellen pro Milliliter
ATCC 700392:	4,0 x 10 <sup>8</sup> Zellen pro Milliliter
ATCC 51932:	5,4 x 10 <sup>8</sup> Zellen pro Milliliter
IMMi 576:	5,5 x 10 <sup>8</sup> Zellen pro Milliliter
IMMI 583:	6,2 x 10 <sup>8</sup> Zellen pro Milliliter
IMMi 589:	7,0 x 10 <sup>8</sup> Zellen pro Milliliter

Die Zellzahl in den Suspensionen mit dem Trübungsstandard McFarland Nr. 3 bewegt sich bei allen sechs *H. pylori*-Stämmen zwischen 4 und 7,2 mal 10<sup>8</sup> Zellen pro Milliliter.

### 3.4.5 Statistische Verfahren

Zur Beschreibung der Kulturausbeute und der Fettsäuremuster wurden drei statistische Maßzahlen verwendet.

□ Das arithmetische Mittel ( $\bar{x}$ ): Das arithmetische Mittel  $\bar{x}$  ist die Summe aller Messwerte  $x_n$  geteilt durch die Anzahl aller Messwerte. Es berechnet sich durch folgende Formel:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} (x_1 + x_2 + \dots x_n) = \frac{\sum x}{n}$$

□ Die Standardabweichung (s): Die Standardabweichung s ist ein Streuungsmaß und veranschaulicht die Verteilung der Messwerte  $x_n$  um den Mittelwert  $\bar{x}$ . Je größer der Wert der Standardabweichung ist, umso weiter liegen die einzelnen Messwerte um den Mittelwert verstreut und je kleiner die Standardabweichung, umso enger liegen die einzelnen Messwerte um den Mittelwert. Die Standardabweichung berechnet sich wie folgt:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_n - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

□ Der Variationskoeffizient (V): Der Variationskoeffizient V beschreibt das Verhältnis der Standardabweichung s zum Mittelwert  $\bar{x}$ . Der Variationskoeffizient ist ein relatives Streuungsmaß. Umso weiter der Variationskoeffizient gegen Null geht, desto kleiner ist die Standardabweichung und desto enger liegen die Messwerte um den Mittelwert. Geht der Variationskoeffizient weiter gegen Eins, so ist die Standardabweichung größer und die einzelnen Messwerte liegen weiter verstreut um den Mittelwert. Der Mittelwert ist also umso aussagefähiger für die Gesamtheit der Messwerte je kleiner der Variationskoeffizient ist.

Mit Hilfe von Variationskoeffizienten lassen sich auch die Streuungen verschiedener Messreihen um ihre unterschiedlich hohen Mittelwerte herum besser miteinander vergleichen. Der Variationskoeffizient lässt sich durch folgende Formel berechnen:

$$V = \frac{s}{\bar{x}}$$

(Sachs 1974)

### **3.5 Einfluss steigender Blutkonzentrationen im Nährmedium auf die Koloniebildungszeit, die Kulturausbeute und das Fettsäuremuster von *H. pylori***

#### **3.5.1 Einfluss steigender Blutkonzentrationen im Nährmedium auf die Koloniebildungszeit von *H. pylori***

Um zu ermitteln, wie schnell auf den verschiedenen bluthaltigen Nährmedien ein Wachstum von *H. pylori* sichtbar wird, wurden vier Tage alte Platten von jeder bluthaltigen Nährbodenzusammensetzung mit allen sechs Stämmen durch Überspülen beimpft. Dazu wurde jeweils ein Milliliter Bakteriensuspension auf den Agar pipettiert und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden einige Minuten luftgetrocknet und anschließend bei 37°C mikroaerob bebrütet.

Die Nährböden wurden täglich auf Koloniewachstum überprüft und es wurde jeweils der Tag der Inkubation notiert, an dem nach der Beimpfung der Platten das erste Koloniewachstum makroskopisch sichtbar war. Als sichtbares Wachstum galten dabei sowohl Einzelkolonien als auch ein Bakterienrasen.

Der Versuch wurde zweimal mit allen sechs *H. pylori*-Stämmen auf CM55- und Isosensitest-Agar mit jeweils 1%, 2,5%, 5%, 7,5% und 10% Blutzusatz durchgeführt. Im Ergebnis wurde das Wachstum nur dann als positiv bewertet, wenn eine Nährbodenzusammensetzung in beiden Versuchsdurchläufen bewachsen war.

### 3.5.2 Einfluss steigender Blutkonzentration im Nährmedium auf die Kulturausbeute von *H. pylori*

Um zu ermitteln, ob und inwieweit die Blutkonzentration im Nährmedium Einfluss auf die Kulturausbeute von *H. pylori* hat, wurden vier Tage alte Platten von jeder bluthaltigen Nährbodenzusammensetzung mit jedem Stamm durch Überspülen beimpft. Dazu wurde jeweils ein Milliliter Bakteriensuspension auf den Agar pipettiert und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden einige Minuten luftgetrocknet und anschließend bei 37°C mikroaerob bebrütet.

Zur Bestimmung der Kulturausbeute wurden die Bakterien am sechsten Tag nach der Beimpfung mit einer 10µl-Öse komplett von der Platte abgetragen. Die Ernte wurde in einem mit 1 ml Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4) gefüllten Eppendorfgefäß suspendiert. Nach Zentrifugation (14.000 U/min für 5 min) wurde das Feuchtgewicht des Zentrifugates in mg bestimmt. Dieser Versuch wurde zweimal mit allen sechs *H. pylori*-Stämmen auf CM55- und Isosensitest-Agar mit jeweils 1%, 2,5%, 5%, 7,5% und 10% Blutzusatz durchgeführt.

### 3.5.3 Einfluss steigender Blutkonzentrationen im Nährmedium auf das Fettsäuremuster von *H. pylori*

Um zu ermitteln, ob die Blutkonzentration im Nährmedium einen Einfluss auf das Fettsäuremuster der sechs verwendeten *H. pylori*-Stämme hat, wurden Isosensitest- und CM55-Nährböden mit den Blutkonzentrationen 2,5%, 5% und 10% jeweils durch Überspülen beimpft. Dazu wurde jeweils ein Milliliter Bakteriensuspension auf den Agar pipettiert und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden einige Minuten luftgetrocknet und anschließend bei 37°C mikroaerob bebrütet.

Zur Untersuchung des Fettsäuremusters von *H. pylori* mittels Gaschromatographie wurden alle Platten am sechsten Tag nach der Beimpfung mit einer 10µl-Öse von den Platten abgeerntet. Die Ernte wurde in jeweils einem Milliliter Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4) in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß einmal gewaschen und für fünf Minuten bei 14.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Sediment und Überstand wurden bei -20°C bis zur Aufbereitung für die Gaschromatographie aufbewahrt.



Am Tag der Bestimmung des Fettsäuremusters wurden die Bakteriensuspensionen zunächst aufgetaut. Die Gefäße wurden zentrifugiert, das Volumen des Sedimentes wurde bestimmt und der Überstand verworfen. Zur Fettsäureanalyse wurden Volumina von mindestens 10 µl Erntemenge verwendet. Durch Auffüllen der Gefäße mit Pufferlösung wurde das Volumen des Sedimentes verdoppelt und so eine ca. 50%ige Suspension von Bakterien in Phosphatpuffer hergestellt. Bei Sedimentvolumina von 20 µl und weniger wurden durchweg 20 µl Pufferlösung zugegeben, um ein ausreichend großes Volumen zu erreichen. 20 bis 90 µl dieser Suspension wurden für die Flüssiggaschromatographie aufbereitet. Die Aufbereitung erfolgte nach einer vom Hersteller vorgegebenen Methode die unter Punkt 3.4.2 beschrieben wird. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt, als Ergebnis wurde der Mittelwert der beiden Messergebnisse angegeben.

### **3.6 Einfluss steigender Albuminkonzentrationen im Nährmedium auf die Koloniebildungszeit, die Kulturausbeute und das Fettsäuremuster von *H. pylori***

#### **3.6.1 Einfluss steigender Albuminkonzentrationen im Nährmedium auf die Koloniebildungszeit von *H. pylori***

Um zu ermitteln, wie schnell auf albuminhaltigen Nährmedien ein Wachstum der sechs *H. pylori*-Stämme sichtbar wird, wurde jeweils ein Milliliter Bakteriensuspension auf den Agar pipettiert und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden einige Minuten luftgetrocknet und anschließend bei 37°C mikroaerob bebrütet.

Die Nährböden wurden täglich hinsichtlich ihres Wachstums überprüft und es wurde jeweils der Kulturtag bestimmt, an dem das erste Koloniewachstum makroskopisch sichtbar war. Als sichtbares Wachstum galten dabei sowohl ein Bakterienrasen als auch Einzelkolonien.

Der Versuch wurde zweimal mit jeweils vier Tage alten Kulturen aller sechs *H. pylori*-Stämme auf CM55- und Isosensitest-Agar mit jeweils 0,05%, 0,1%, 0,25%, 0,5% und 1% Albuminzusatz durchgeführt. Im Ergebnis wurde das Wachstum nur als positiv bewertet, wenn eine Nährbodenzusammensetzung in beiden Versuchsdurchläufen bewachsen war.

### 3.6.2 Einfluss steigender Albuminkonzentrationen im Nährmedium auf die Kulturausbeute von *H. pylori*

Um zu untersuchen, ob die Konzentration von Albumin im Nährmedium einen Einfluss auf die Menge des Bakterienwachstums hat, wurden vier Tage alte Platten von jeder albuminhaltigen Nährbodenzusammensetzung mit jedem der verwendeten *H. pylori*-Stämme durch Überspülen beimpft. Dazu wurde jeweils ein Milliliter Bakteriensuspension auf den Agar pipettiert und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden einige Minuten luftgetrocknet und anschließend bei 37°C mikroaerob bebrütet.

Zur Bestimmung der Erntemenge wurden die Bakterien am sechsten Tag nach der Beimpfung mit einer 10µl-Öse komplett von der Platte abgetragen und in 1 ml Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4) in einem Eppendorfgefäß gewaschen. Nach Zentrifugation (14.000 U/min für 5 min) wurde das Volumen des Sedimentes mit einer vorpipettierten Volumenreihe (ab 5 µl, in 5 µl ansteigend in 1,5 ml Eppendorfgefäßen) Pufferlösung verglichen und das Ernteergebnis in mg Feuchtgewicht bestimmt.

Dieser Versuch wurde zweimal mit vier Tage alten Kolonien aller sechs *H. pylori*-Stämme auf CM55- und Isosensitest-Agar mit jeweils 0,05%, 0,1%, 0,25%, 0,5% und 1,0% Albuminzusatz durchgeführt.

### 3.6.3 Einfluss steigender Albuminkonzentrationen im Nährmedium auf das Fettsäuremuster von *H. pylori*

Um den Einfluss steigender Albuminkonzentrationen im Nährmedium auf das Fettsäuremuster von *H. pylori* zu untersuchen, wurden Isosensitest- und CM55-Nährböden mit Albuminkonzentrationen von 0,1%, 0,5% und 1,0% durch Überspülen beimpft. Dazu wurde jeweils ein Milliliter Bakteriensuspension auf den Agar pipettiert und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden einige Minuten luftgetrocknet und anschließend bei 37°C mikroaerob bebrütet.

Alle Platten wurden am sechsten Tag nach der Beimpfung mit einer 10µl-Öse abgeerntet. Die Ernte wurde in einem Milliliter Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4) in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß einmal gewaschen und für fünf Minuten bei 14.000 Umdrehungen/min

zentrifugiert. In dieser Form wurde die Ernte bei -20°C bis zur Aufbereitung für die Gaschromatographie aufbewahrt.

Am Tag der Bestimmung des Fettsäuremusters wurden die Bakteriensuspensionen zunächst aufgetaut. Die Gefäße wurden zentrifugiert, das Volumen des Zentrifugats wurde bestimmt und der Überstand verworfen. Zur Fettsäureanalyse wurden Volumina von mindestens 10 µl Erntemenge verwendet. Durch Auffüllen der Gefäße mit Pufferlösung wurde das Volumen des Zentrifugats verdoppelt und so eine ca. 50%ige Suspension von Bakterien in Phosphatpuffer hergestellt. Bei Zentrifugatvolumina von 20 µl und weniger wurden durchweg 20 µl Pufferlösung zugegeben, um ein ausreichend großes Volumen zu erreichen. Diese Suspension stellte die Bakterienprobe dar, deren Fettsäuremuster bestimmt wurde. Die Aufbereitung erfolgte nach einer vom Hersteller vorgegebenen Methode die unter Punkt 3.4.2 beschrieben wird. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt, die Ergebnisse aus beiden Versuchsdurchläufen wurden zu einem Mittelwert zusammengefasst.

### **3.7 Einfluss zunehmender Kulturdauer auf bluthaltigen und albuminhaltigen Nährmedien auf die Morphologie und das Fettsäuremuster von *H. pylori***

#### **3.7.1 Einfluss zunehmender Kulturdauer auf die Zellmorphologie von *H. pylori***

Um den Einfluss zunehmender Kulturdauer auf die Zellmorphologie von *H. pylori* zu untersuchen, wurden Isosensitest-5%-Schafblut-Agar und Isosensitest-0,5%-Albuminagar mit den laboradaptierten *H. pylori*-Stämmen ATCC 43504 und ATCC 700392 sowie mit den frischisolierten *H. pylori*-Stämmen IMMi 576 und IMMi 589 beimpft. Dazu wurde jeweils 0,5 ml Bakteriensuspension auf den Agar pipettiert und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden einige Minuten luftgetrocknet und anschließend bei 37°C mikroaerob bebrütet.

Jeweils am dritten, vierten, fünften, sechsten und elften Tag wurden von jedem Stamm, jeweils nach Kultur auf beiden Nährboden, je zwei Objektträgerpräparate angefertigt und mit Fuchsinrot gefärbt (3.4.1). Unter dem Lichtmikroskop wurden bei 400facher Vergrößerung in jedem Präparat 100 Zellen hinsichtlich ihrer Wuchsformen differenziert.

Dabei wurde zwischen Stäbchen-, Bogen- und Rundformen unterschieden. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt.

### 3.7.2 Einfluss zunehmender Kulturdauer auf das Fettsäuremuster von *H. pylori*

Um den Einfluss einer zunehmenden Kulturdauer auf das Fettsäuremuster von *H. pylori* zu überprüfen, wurden Isosensitest-5%-Schafblutagar und Isosensitest-0,5%-Albuminagar mit den *H. pylori*-Stämmen ATCC 43504, ATCC 700392, IMMi 576 und IMMi 589 beimpft. Dazu wurden jeweils 0,5 ml Bakteriensuspension auf den Agar pipettiert und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden einige Minuten luftgetrocknet und anschließend bei 37°C mikroaerob bebrütet.

Jeweils am dritten, vierten, fünften, sechsten und elften Tag wurde von beiden Nährbodenzusammensetzungen pro Stamm eine Platte mit einer 10-µl-Öse abgeerntet und die Ernte in 1 ml Phosphatpuffer (pH 7,4) suspendiert. Die Bakteriensuspensionen wurden für fünf Minuten bei 14.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, das Volumen des Sedimentes wurde bestimmt und der Überstand verworfen. Durch Auffüllen der Gefäße mit Pufferlösung wurde das Volumen des Sedimentes verdoppelt und so eine ca. 50%ige Suspension von Bakterien in Phosphatpuffer hergestellt. Diese Bakteriensuspensionen wurden für die Flüssiggaschromatographie aufbereitet. Die Aufbereitung erfolgte nach einer vom Hersteller vorgegebenen Methode, die unter Punkt 3.4.2 beschrieben wird. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt, als Ergebnis wurde der Mittelwert der beiden Messergebnisse angegeben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Fettsäuren in den Nährmedien

Die Gaschromatographie der Nährmedien ergab, dass in CM55-pur keine Fettsäuren enthalten sind. Die Medien Iso-pur, CM55-1%-Albumin und Iso-1%-Albumin enthalten lediglich Spuren von Palmitinsäure (16:0). Die mit 10% Schafblut supplementierten Nährmedien beider Grundsubstrate enthalten Fettsäuren. Es konnten jeweils die gleichen fünf Fettsäuren nachgewiesen werden. Den Hauptanteil machte dabei die Ölsäure (18:1 ω9c) mit 43,37-43,97% aus, gefolgt von Stearinsäure (18:0) mit 19,59-20,69% und Palmitinsäure (16:0) mit 18,34-20,13%. Weitere 13,32-15,36% des Fettsäuremusters machte eine Fettsäurefraktion aus, die als Linolsäure (18:2 ω6,9c) oder Anteiso-Octadecansäure (18:0 ante) bezeichnet wird und nicht weiter differenziert werden kann. Den kleinsten Anteil machte jeweils Arachidonsäure (20:4 ω6,9,12,15c) mit 3,03-3,09% aus. Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Fettsäureanalysen der verschiedenen Nährmedien.

**Tabelle 2:** Fettsäuremuster unbeimpfter Nährmedien der Grundsubstrate CM55 und Isosensitest, jeweils pur sowie supplementiert mit 1% Albumin bzw. 10% Schafblut

Nährmedium	Fettsäure in %				
	16:0	18:1 ω9c	18:0	20:4 ω6,9,12,15c	18:2 ω6,9c o. 18:0 ante
CM55-pur	0	0	0	0	0
CM55-1%-A	0*	0	0	0	0
CM55-10%-B	18,34	43,37	20,69	3,03	15,36
Iso-pur	0*	0	0	0	0
Iso-1%-A	0*	0	0	0	0
Iso-10%-B	20,13	43,97	19,59	3,09	13,32

\* Spuren

Die Ergebnisse in Tabelle 2 zeigen, dass die Fettsäuren, die in den bluthaltigen Nährmedien enthalten sind, aus dem Blutanteil im Medium stammen, da in den jeweiligen Medien aus den Grundsubstraten ohne Zusatz keine bzw. nur Spuren von Fettsäuren enthalten sind. Auch Albumin enthält keine Fettsäuren.

#### 4.2 Einfluss steigender Blut- und Albuminkonzentrationen im Nährmedium auf die Koloniebildungszeit von *H. pylori*

Tabelle 3 zeigt den Einfluss der Blutkonzentration in CM55- und Isosensitest-Medien auf die Koloniebildungszeit von *H. pylori*. Der Zusatz von Schafblut in den Konzentrationen 1%, 2,5%, 5%, 7,5% und 10% führt auf beiden Grundsubstraten zu einem Wachstum aller sechs Stämme innerhalb von sechs Tagen.

**Tabelle 3:** Anzahl der nach sechs Tagen auf mit unterschiedlichen Konzentrationen an Schafblut supplementierten CM55- und Isosensitest-Medien gewachsenen *H. pylori*-Stämme

Grundsubstrat	Anzahl der nach spätestens 6 Tagen gewachsenen <i>H. pylori</i> -Stämme					
	Blutzusatz in %					
	0	1	2,5	5	7,5	10
CM 55	2	6	6	6	6	6
ISO	3	6	6	6	6	6

Hinsichtlich der Koloniebildungszeit ist also ein Supplement von 1% Schafblut in beiden verwendeten Nährbodengrundsubstraten ausreichend, um ein zügiges Koloniewachstum von *H. pylori* zu erzielen. Die Zugabe von mehr als 1% Blutsupplement im Nährmedium bringt hier keine weiteren Vorteile. Auf unsupplementiertem CM55-Agar wuchsen nur einzelne Kolonien von zwei der sechs Stämme, auf unsupplementiertem Isosensitest-Agar nur einzelne Kolonien von drei der sechs Stämme innerhalb von sechs Tagen an.

Tabelle 4 zeigt den Einfluss von Albuminzusatz in Nährmedien aus den Grundsubstraten CM55 und Isosensitest auf das Wachstum von *H. pylori*. Der Zusatz von Albumin in den Konzentrationen 0,05%, 0,1%, 0,25%, 0,5% und 1,0% zu CM55-Agar ermöglicht allen sechs eingesetzten *H. pylori*-Stämmen das Wachstum innerhalb von sechs Tagen. Auf Isosensitest-Agar mit einer Albuminkonzentration von 0,05% wuchsen vier von sechs Stämmen innerhalb von sechs Tagen an. Bei einer Albuminkonzentration von 0,1% und 0,25% zeigen fünf von sechs Stämmen ein sichtbares Wachstum nach sechs Tagen. Albuminkonzentrationen von 0,5% und 1,0% in Isosensitest-Agar führen bei allen sechs eingesetzten Stämmen zu einem sichtbaren Wachstum innerhalb von sechs Tagen.

**Tabelle 4:** Anzahl der spätestens am sechsten Kulturtag auf albuminsupplementierten Medien verschiedener Konzentrationen gewachsenen *H. pylori*-Stämme

Grundsubstrat	Anzahl der nach spätestens 6 Tagen gewachsenen Stämme				
	Albuminzusatz in %				
	0,05	0,1	0,25	0,5	1
CM 55	6	6	6	6	6
ISO	4	5	5	6	6

Um ein Wachstum aller Stämme zu ermöglichen, ist Albumin als Supplement für beide Nährmediengrundsubstrate geeignet. CM55-Medien führen dabei bereits mit niedrigeren Albuminkonzentrationen zu einem erfolgreichen Wachstum aller Stämme als Isosensitest-Medien. Eine Steigerung der Albuminkonzentration über 0,05% bei CM55-Medien und über 0,5% bei Isosensitest-Medien bringt hinsichtlich der Koloniebildungszeit keinen weiteren Vorteil.

Tabelle 5 zeigt den Tag des durchschnittlichen Wachstumsbeginns der sechs untersuchten *H. pylori*-Stämme nach Kultur auf den verschiedenen Nährmedien.

**Tabelle 5:** Durchschnittlicher Wachstumsbeginn von *H. pylori* auf albuminhaltigen und bluthaltigen Nährmedien

Nährmedium	Tag des durchschnittlichen Wachstumsbeginns				
	Blutgehalt im Medium				
	1%	2,5%	5%	7,5%	10%
CM55	1,5	1	1	1	1
Iso	1,3	1	1	1	1
	Albumingehalt im Medium				
	0,05%	0,1%	0,25%	0,5%	1%
CM55	2	2,3	1,5	2,3	1,3
Iso	1,8	2,2	1,8	1,8	1,7

Insgesamt war bei Kultur auf bluthaltigen Medien ein zügigeres Wachstum von *H. pylori* zu beobachten als bei Kultur auf albuminhaltigen Medien. Für eine möglichst schnelle Anzucht von *H. pylori*-Kulturen ist es also sinnvoll, die verwendeten Nährmedien mit Schafblut zu supplementieren.

#### 4.3 Einfluss steigender Blut- und Albuminkonzentrationen im Nährmedium auf die Kulturausbeute von *H. pylori*

Tabelle 6 zeigt die Erntemengen von *H. pylori* am sechsten Inkubationstag nach Kultur auf Nährmedien aus dem Grundsubstrat CM55 sowohl pur als auch supplementiert mit Blut in ansteigenden Konzentrationen von 1% bis 10%. Als statistische Angaben sind in der Tabelle der Mittelwert, die Standardabweichung, der Variationskoeffizient sowie die Maximal- und Minimalwerte aufgeführt.

**Tabelle 6:** Erntemengen von *H. pylori* pro Kulturplatte in mg Feuchtgewicht (FG) am sechsten Tag nach Kultur auf CM55-Medien mit ansteigender Schafblutkonzentration

Grundsubstrat	<i>H. pylori</i> -Stamm	Mittelwerte der Erntemengen am 6. Kulturtag [mg FG]					
		Blutkonzentration					
		0%	1%	2,5%	5%	7,5%	10%
CM55	ATCC 43504	0	13	35	40	48	53
	ATCC 700392	0	15	25	23	25	25
	ATCC 51932	0	35	63	33	45	55
	IMMi 576	0	15	25	28	25	25
	IMMi 583	0	20	25	35	35	25
	IMMi 589	0	10	8	10	10	15
	Mittelwert		18	30	28	31	33
	Standardabweichung		8,2	16,7	9,7	13,0	15,3
	Variationskoeffizient		0,46	0,56	0,35	0,42	0,46
	Maximum		35	63	40	48	55
	Minimum		10	8	10	10	15

Ein leichter Einfluss der Blutkonzentration in CM55-Medien auf die Erntemenge von *H. pylori* ist nach sechs Inkubationstagen zu erkennen. Auf CM55-1%-Schafblutagar wurde durchschnittlich eine Erntemenge von 18 mg Feuchtgewicht erzielt. Der gesteigerte Blutgehalt auf 2,5% führt zu einer eindeutigen Erhöhung auf durchschnittlich 30 mg. Eine weitere Steigerung des Blutgehaltes im CM55-Medium führte zu keiner nennenswerten Änderung der durchschnittlichen Kulturausbeute.

Der Variationskoeffizient liegt bei den verwendeten Blutkonzentrationen zwischen 0,35 und 0,56. Dies sind im Hinblick auf mögliche Werte zwischen 0 und 1, bei denen das Optimum gegen Null ginge (3.4.5), relativ hohe Werte, was beschreibt, dass die verschiedenen Stämme sich in ihrem Wachstum hinsichtlich der Kulturausbeute stark unterscheiden. Am geringsten ist der Variationskoeffizient bei einem Blutgehalt von 5% im Nährmedium, was besagt, dass sich bei dieser Konzentration das Wachstumsverhalten der untersuchten Stämme hinsichtlich der Kulturausbeute am ähnlichsten ist.



Der laboradaptierte Stamm ATCC 43504 zeigt einen relativ kontinuierlichen Anstieg der Erntemenge mit ansteigender Blutkonzentration. Der laboradaptierte Stamm ATCC 51932 zeigt schwankende Ernteergebnisse, jedoch insgesamt einen Anstieg der Erntemenge mit zunehmender Blutkonzentration im Nährmedium. Die Maximalwerte wurden in jedem Fall von einem dieser beiden laboradaptierten Stämme geliefert. Die Kulturausbeute der übrigen vier Stämme wird durch die Konzentration an Schafblut im Nährmedium kaum beeinflusst. Auffällig sind die Ernteergebnisse des frischisolierten *H. pylori*-Stammes IMMi 589 gegenüber den Ergebnissen der fünf anderen Stämme. Die Kulturausbeute von IMMi 589 stieg keinesfalls über 15 mg Feuchtwicht, unabhängig von der Blutkonzentration und stellte in jedem Fall das Minimum.

Tabelle 7 zeigt die Erntemengen von *H. pylori* am sechsten Inkubationstag nach Kultur auf Nährmedien aus dem Grundsubstrat Isosensitest mit ansteigender Schafblutkonzentration.

**Tabelle 7:** Erntemengen von *H. pylori* pro Kulturplatte in mg Feuchtwicht (FG) am sechsten Tag nach Kultur auf Isosensitest-Medien mit ansteigender Schafblutkonzentration

Grundsubstrat	<i>H. pylori</i> -Stamm	Mittelwerte der Erntemengen am 6. Kulturtag [mg Feuchtwicht]					
		Blutkonzentration					
		0%	1%	2,5%	5%	7,5%	10%
Isosensitest	ATCC 43504	0	85	105	113	115	108
	ATCC 700392	0	55	100	110	105	120
	ATCC 51932	0	110	128	135	143	148
	IMMi 576	0	105	140	130	130	143
	IMMi 583	0	63	70	85	78	95
	IMMi 589	0	53	98	130	103	90
	Mittelwert		79	107	117	112	117
	Standardabweichung		23,0	22,5	17,1	20,7	22,1
	Variationskoeffizient		0,25	0,19	0,15	0,18	0,22
	Maximum		110	140	135	143	148
	Minimum		53	70	85	78	90

Auch bei Kultur auf blutsupplementierten Nährmedien aus dem Grundsubstrat Isosensitest lässt sich ein leicht steigernder Einfluss der Blutkonzentration auf die durchschnittliche Kulturausbeute von *H. pylori* feststellen. Den größten fördernden Einfluss auf die Erntemengen der sechs verwendeten Stämme hat auch hier wieder die Steigerung der Blutkonzentration im Nährmedium von 1% auf 2,5%. Dies bewirkt einen Anstieg der durchschnittlichen Erntemenge von 79 mg auf 107 mg. Eine weitere Erhöhung der Blutkonzentration im Nährmedium bewirkt immerhin einen weiteren Anstieg der durchschnittlichen Erntemenge auf 117 mg.

Der Variationskoeffizient liegt bei allen verwendeten Blutkonzentrationen relativ niedrig, was bedeutet, dass die verschiedenen Stämme sich hinsichtlich der Kulturausbeute nicht stark voneinander unterscheiden. Bei einer Schafblutkonzentration von 5% ist der Variationskoeffizient am niedrigsten, was besagt, dass die Erntemengen der verschiedenen Stämme bei dieser Blutkonzentration in Nährmedien aus dem Grundsubstrat Isosensitest am engsten beieinander liegen. Zusätzlich zeigt sich der Variationskoeffizient auf Isosensitest-Medien insgesamt deutlich niedriger als auf CM55-Medien, woraus auf ein stabileres Wachstum von *H. pylori* auf Nährmedien aus Isosensitest geschlossen werden kann.

Die drei Stämme ATCC 700392, ATCC 51932 und IMMi 576 zeigten mit ansteigender Blutkonzentration von 1% auf 2,5% im Isosensitest-Medium eine Zunahme der Erntemenge. Die übrigen drei Stämme ATCC 43504, IMMi 583 und IMMi 589 erbrachten bei allen Blutkonzentrationen relativ gleichmäßige Erntemengen und zeigten damit keine Abhängigkeit der Erntemenge von der Konzentration an Schafblut im Isosensitest-Medium. Die Maxima lieferte mit einer Ausnahme der laboradaptierte *H. pylori*-Stamm ATCC 51932. Die Minima stellte ab einer Blutkonzentration von 2,5% ausschließlich der frischisolierte Stamm IMMi 583, dessen Erntemenge immer unterhalb von 100 mg lag.

Die Erntemengen von *H. pylori* nach sechstägiger Kultur auf albuminhaltigen CM55-Medien mit ansteigender Konzentration des Supplementes zeigt Tabelle 8. Zusätzlich zeigt die Tabelle für jede Albuminkonzentration im Nährboden den Mittelwert der Erntemengen der verwendeten Stämme, die Standardabweichung, den Variationskoeffizienten sowie die Maximum- und Minimum-Werte.

**Tabelle 8:** Erntemengen von *H. pylori* pro Kulturplatte in mg Feuchtwicht (FG) am sechsten Tag nach Kultur auf CM55-Medien mit ansteigender Albuminkonzentration

Grundsubstrat	<i>H. pylori</i> -Stamm	Mittelwerte der Erntemengen am 6. Kulturtag [mg FG]				
		Albuminkonzentration				
		0,05%	0,10%	0,25%	0,50%	1%
CM55	ATCC 43504	28	45	45	38	43
	ATCC 700392	15	10	25	13	28
	ATCC 51932	28	38	35	35	33
	IMMi 576	20	13	28	18	30
	IMMi 583	23	15	35	23	33
	IMMi 589	10	15	15	13	13
	Mittelwert	21	23	31	23	30
	Standardabweichung	6,6	13,6	9,4	9,9	8,9
	Variationskoeffizient	0,31	0,59	0,30	0,43	0,30
	Maximum	28	45	45	38	43
	Minimum	10	10	15	13	13

Die Mittelwerte der Erntemengen zeigen keine Abhängigkeit von der Konzentration an Albumin im Nährmedium. Bei Albuminkonzentrationen von 0,05%, 0,1% und 0,5% liegt der Mittelwert ungefähr bei 20 mg Feuchtgewicht. Bei Konzentrationen von 0,25% und 1,0% an Albumin liegt der Mittelwert der Erntemengen bei etwa 30 mg Feuchtgewicht.

Der Variationskoeffizient liegt bei allen verwendeten Albuminkonzentrationen relativ hoch, was beschreibt, dass die verschiedenen Stämme sich in ihrem Wachstum hinsichtlich der Kulturausbeute bei jeder verwendeten Albuminkonzentration im CM55-Medium stark unterscheiden.

Die Erntemengen der einzelnen Stämme zeigen alle leicht schwankende Ergebnisse, unabhängig von der Albuminkonzentration im CM55-Medium. Der laboradaptierte Stamm ATCC 43504 stellt bei jeder Albuminkonzentration den Maximalwert. Auffällig niedrig ist die Kulturausbeute von IMMi 589 im Gegensatz zu allen anderen untersuchten *H. pylori*-Stämmen. IMMi 589 erreichte keine Werte oberhalb von 15 mg Feuchtgewicht und stellte damit immer den Minimalwert.

Tabelle 9 listet die Erntemengen für *H. pylori* nach sechstägiger Kultur auf Isosensitest-Nährböden mit ansteigender Albuminkonzentration auf.

**Tabelle 9:** Erntemengen von *H. pylori* pro Kulturplatte in mg Feuchtgewicht (FG) am sechsten Tag nach Kultur auf Isosensitest-Medien mit ansteigender Albuminkonzentration

Grundsbsrat	<i>H. pylori</i> -Stamm	Mittelwerte der Erntemengen am 6. Kulturtag [mg FG]				
		Albuminkonzentration				
		0,05%	0,10%	0,25%	0,50%	1%
Iso	ATCC 43504	38	33	25	78	140
	ATCC 700392	33	40	110	110	85
	ATCC 51932	38	68	98	108	140
	IMMi 576	13	33	48	143	125
	IMMi 583	40	80	100	135	110
	IMMi 589	45	120	170	160	113
	Mittelwert	35	62	92	122	119
	Standardabweichung	10,2	31,3	46,4	26,9	19,1
	Variationskoeffizient	0,29	0,5	0,50	0,22	0,16
	Maximum	45	120	170	160	140
	Minimum	13	33	25	78	85

Die Mittelwerte der Erntemengen der *H. pylori*-Stämme nach Kultur auf Isosensitest-Medien mit ansteigender Albuminkonzentration zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Kulturausbeute vom Albumingehalt im Nährboden. Bis zu einem Albumingehalt von 0,5% lassen sich in jedem untersuchten Konzentrationsschritt die mittleren Erntemengen um ca.

30 mg steigern, insgesamt also um mehr als das Vierfache. Die weitere Erhöhung des Albumingehaltes von 0,5% auf 1,0% führt zu keiner weiteren nennenswerten Veränderung der mittleren Kulturausbeute von *H. pylori*.

Der Variationskoeffizient liegt nach Kultur auf Isosensitest-1%-Albuminmedien sehr niedrig, gegenüber den Werten bei den niedrigeren Konzentrationen. Dies beschreibt, dass das Wachstum der verwendeten *H. pylori*-Stämme bei einer Albuminkonzentration von 1% im Isosensitest-Medium stabiler ist als bei den niedrigeren verwendeten Konzentrationen. Es können also bei einer hohen Albuminkonzentration ähnliche Erntemengen von den verschiedenen Stämmen erwartet werden, im Gegensatz zu stark differierenden Ergebnissen der verschiedenen Stämme bei geringer Albuminkonzentration im Isosensitest-Medium.

Der frischisolierte Stamm IMMi 589 stellte bis zu einer Albuminkonzentration von 0,5% den Maximalwert. Bei der höchsten Albuminkonzentration stellt diesen der laboradaptierte Stamm ATCC 43504. Ebenfalls ATCC 43504 stellt für die Albuminkonzentrationen 0,1% bis 0,5% den Minimalwert.

Alle verwendeten Stämme haben auf Medien aus dem Grundsubstrat Isosensitest gegenüber CM55 unabhängig vom Supplement eine um mindestens das Dreifache höhere Erntemenge erreicht. Auffällig ist, dass auf den drei Nährmedienzusammensetzungen CM55-Blut, CM55-Albumin und Isosensitest-Blut die minimale Erntemenge immer von einem frischisolierten Stamm und, mit einer Ausnahme, die maximale Erntemenge von einem laboradaptierten Stamm gestellt wird. Bei der Nährbodenzusammensetzung Isosensitest-Albumin ist dieses Verhältnis umgekehrt.

Zur genaueren Betrachtung der Verhältnisse der durchschnittlichen Erntemengen frischisolierter und laboradaptierter *H. pylori*-Stämme stellt Tabelle 10 die Erntemengen der beiden verwendeten Stammgruppen ATCC und IMMi nach Kultur zunächst auf bluthaltigen Medien gegenüber und zeigt Unterschiede auch bezüglich der beiden verwendeten Grundsubstrate auf. Der Quotient Q aus den durchschnittlichen Erntemengen der ATCC-Stämme geteilt durch die der IMMi-Stämme soll Unterschiede in der Kulturausbeute zwischen frischisolierten und laboradaptierten *H. pylori*-Stämmen auf den unterschiedlichen Grundsubstraten aufzeigen. Ein Quotient größer Eins bedeutet, dass die

Kulturausbeute der ATCC-Gruppe größer ist, ein Quotient kleiner Eins steht für eine größere Kulturausbeute der IMMi-Gruppe.

**Tabelle 10:** Durchschnittliche Erntemengen pro Kulturplatte der ATCC-Stämme gegenüber denen der IMMi-Stämme nach Kultur auf Blutmedien aus zwei verschiedenen Grundsubstraten

Stämme	Blutkonzentration in CM55				
	1%	2,5%	5%	7,5%	10%
Erntemenge in mg					
ATCC	21	41	32	39	44
IMMi	14	19	23	23	23
Q	1,5	2,2	1,4	1,7	1,9
Stämme	Blutkonzentration in Isosensitest				
	1%	2,5%	5%	7,5%	10%
Erntemenge in mg					
ATCC	83	111	119	121	132
IMMi	82	99	107	107	112
Q	1,01	1,1	1,1	1,3	1,2

Q ist der Quotient aus ATCC geteilt durch IMMi.

Die laboradaptierten Stämme erreichten auf bluthaltigen Medien beider Grundsubstrate die höhere Kulturausbeute gegenüber frischisolierten Stämmen, was durch den Quotienten Q größer als Eins deutlich wird. Dieser Unterschied hinsichtlich der Wachstumsmenge zwischen den beiden Stammgruppen zugunsten der ATCC-Gruppe ist auf CM55-Medien deutlicher ausgeprägt als auf Isosensitest-Medien. Zusätzlich ist aus Tabelle 10 ersichtlich, dass beide Stammgruppen auf Isosensitest-Blutmedien reichhaltiger wuchsen als auf CM55-Blutmedien.

Tabelle 11 vergleicht die durchschnittliche Erntemenge der laboradaptierten mit der durchschnittlichen Erntemenge der frischisolierten *H. pylori*-Stämme nach Kultur auf albuminhaltigen Nährböden aus den verschiedenen Grundsubstraten CM55 und Isosensitest. Der Quotient Q in Tabelle 11 soll Unterschiede in der Kulturausbeute zwischen frischisolierten und laboradaptierten *H. pylori*-Stämmen auf den unterschiedlichen Grundsubstraten aufzeigen.

**Tabelle 11:** Durchschnittliche Erntemengen pro Kulturplatte der ATCC-Stämme gegenüber denen der IMMi-Stämme nach Kultur auf Albuminmedien aus zwei verschiedenen Grundsubstraten

Stämme	Albuminkonzentration in CM55				
	0,05%	0,1%	0,25%	0,5%	1%
	Erntemenge in mg FG				
ATCC	23	31	35	28	34
IMMi	18	14	26	18	25
Q	1,3	2,2	1,3	1,6	1,4

Stämme	Albuminkonzentration in Isosensitest				
	0,05%	0,1%	0,25%	0,5%	1%
	Erntemenge in mg FG				
ATCC	23	35	78	98	122
IMMi	32	78	96	137	116
Q	0,7	0,4	0,8	0,7	1,1

Q ist der Quotient aus ATCC geteilt durch IMMi.

Nach Kultur von *H. pylori* auf CM55-Medien mit Albuminzusatz in verschiedenen Konzentrationen war die Kulturausbeute der laboradaptierten Stämme durchweg größer als die der frischisolierten Stämme. Dies verdeutlicht der Quotient Q. Eine höhere Kulturausbeute der frischisolierten *H. pylori*-Stämme gegenüber den laboradaptierten Stämmen konnte dahingegen nach Kultur auf Isosensitest-Medien mit Albuminkonzentrationen von 0,05% bis 0,5% aufgezeigt werden. Auf Isosensitest-1%-Albuminmedien war erneut die Ernte der laboradaptierten Stämme reichhaltiger als die der frischisolierten, obgleich hier der Unterschied sehr gering ist.

Aus Tabelle 11 geht des Weiteren hervor, dass, wie bereits nach Kultur auf bluthaltigen Medien beobachtet, beide Stammgruppen auf Medien aus dem Grundsubstrat Isosensitest reichhaltiger wuchsen als auf Medien aus dem Grundsubstrat CM55.

Die Höhe der Kulturausbeute wurde also wesentlich durch die Auswahl des Grundsubstrates und nicht durch die Supplementierung beeinflusst. Die Ernten der auf Isosensitest-Medien gewachsenen *H. pylori*-Kulturen ergaben regelmäßig mehr als die dreifache Menge gegenüber den Ernten von auf CM55-Medien gewachsenen *H. pylori*-Kulturen.

Nach Kultur auf Nährböden aus CM55-Grundsubstrat erbrachten weiterhin die frischisolierten Stämme durchweg eine geringere Erntemenge als die laboradaptierten Stämme.

#### 4.4 Einfluss steigender Blut- und Albuminkonzentrationen im Nährmedium auf das Fettsäuremuster von *H. pylori*

Im Fettsäuremuster von *H. pylori* wurden in dieser Studie diejenigen Fettsäuren berücksichtigt, deren Anteil regelmäßig mehr als ein Prozent ausmachte. Dies waren die acht Fettsäuren Myristinsäure (14:0), Palmitinsäure (16:0), 3-Hydroxypalmitinsäure (16:0 3OH), Ölsäure (18:1  $\omega$ 9c), Stearinsäure (18:0), Methylenoctadecansäure (19:0 cyclo), 3-Hydroxystearinsäure (18:0 3OH) und ein gaschromatographisch nicht weiter zu differenzierender Fettsäurekomplex aus verschiedenen Octadecensäuren (18:1-Komplex). Die Hauptanteile im Fettsäuremuster von *H. pylori* stellen - mit zusammen etwa 70% - Myristinsäure (14:0) und Methylenoctadecansäure (19:0 cyclo). Den kleinsten Anteil macht regelmäßig die Ölsäure (18:1  $\omega$ 9c) mit maximal 2,98% aus.

Weitere Fettsäuren, die gemessen wurden, aber hier nicht erwähnt werden, weil sie nur mit geringen Anteilen oder sehr selten vorkamen, sind u. a. Dodecansäure (12:0), Tridecansäure (13:0), Pentadecansäure (15:0), Heptadecansäure (17:0), 3-Hydroxyheptadecansäure (17:0 3OH) und Eicosaensäure (21:1  $\omega$ 9c).

Im Vergleich der Fettsäuremuster von unbeimpften Nährmedien (Tabelle 2) und von *H. pylori* nach Kultur auf bluthaltigen Nährmedien (Tabelle 12) fällt auf, dass drei der in bluthaltigen Nährmedien enthaltenen Fettsäuren, die Palmitinsäure, die Ölsäure und die Stearinsäure, auch im Fettsäuremuster von *H. pylori* zu finden sind, so dass die Vermutung nahe liegt, dass diese Fettsäuren zumindest zum Teil von *H. pylori* aus dem Nährmedium aufgenommen werden. Im Folgenden wird deshalb auf diese drei Fettsäuren ein besonderes Augenmerk gerichtet. Es soll u. a. geprüft werden, ob es Faktoren gibt, die den Gehalt dieser Fettsäuren im Fettsäuremuster von *H. pylori* nach Kultur auf den verschiedenen Nährmedien beeinflussen und ob diese drei Fettsäuren auch im Fettsäuremuster von *H. pylori* nach Kultur auf blutfreien Nährmedien zu finden sind.

In Tabelle 12 sind die Anteile der oben genannten Fettsäuren in Prozent am Gesamtfettsäuremuster von *H. pylori* nach Kultur auf CM55- und Isosensitest-Nährmedien mit ansteigender Blutkonzentration aufgeführt.

**Tabelle 12:** Durchschnittliches Fettsäuremuster verschiedener *H. pylori*-Stämme nach Kultur auf Isosensitest- und CM55-Medien mit ansteigender Blutkonzentration

Nährmedium		Fettsäure in %							
	Stamm	14:0	16:0	16:0 3OH	18:1 w9c	18:1-Komplex	18:0	19:0 cyclo	18:0 3OH
CM55 2,5% Blut									
	ATCC 43504	45,14	2,90	2,16	1,58	1,37	7,83	29,58	4,74
	ATCC 700392	40,05	2,69	3,34	1,26	0,88	7,21	37,11	5,79
	ATCC 51932	45,85	2,57	3,04	1,43	1,48	6,24	33,17	3,65
	IMMi 576	37,41	2,78	2,45	1,86	3,68	6,88	33,76	4,77
	IMMi 583	43,10	2,44	3,01	1,31	3,39	6,88	30,18	4,79
IMMi 589	37,02	3,96	2,33	2,68	5,60	12,41	33,04	0,00	
CM55 5% Blut									
	ATCC 43504	47,45	2,95	1,91	1,57	1,32	7,48	27,39	4,47
	ATCC 700392	40,53	2,46	2,95	1,51	1,01	8,20	36,01	5,51
	ATCC 51932	43,59	2,93	2,89	2,00	1,49	7,96	33,25	3,26
	IMMi 576	40,03	3,12	2,53	1,78	2,96	7,92	35,22	4,87
	IMMi 583	48,12	2,45	3,07	1,28	3,70	6,41	26,98	4,63
IMMi 589	32,83	4,50	2,24	2,85	4,31	14,56	29,58	4,42	
CM55 10% Blut									
	ATCC 43504	47,86	3,28	2,09	1,85	1,64	7,98	26,16	4,27
	ATCC 700392	42,51	3,15	3,32	1,79	0,53	8,86	31,30	5,98
	ATCC 51932	44,20	2,97	2,91	1,88	1,57	7,73	31,81	3,50
	IMMi 576	38,96	3,45	2,65	1,87	2,99	8,93	34,80	5,20
	IMMi 583	47,91	2,90	1,51	1,79	6,43	8,57	25,93	2,29
IMMi 589	26,86	4,77	5,12	2,98	2,94	15,85	26,15	9,00	
Iso 2,5% Blut									
	ATCC 43504	41,28	2,50	3,06	1,02	2,33	8,26	31,86	2,84
	ATCC 700392	41,26	2,75	3,48	1,06	1,21	6,70	34,32	5,57
	ATCC 51932	43,86	2,33	2,94	1,12	1,10	7,31	33,71	4,08
	IMMi 576	39,83	2,35	2,91	1,12	10,42	5,18	29,64	5,03
	IMMi 583	41,49	2,82	3,58	1,28	3,77	5,73	31,67	4,70
IMMi 589	36,20	2,81	3,31	1,33	10,62	6,83	29,00	5,10	
Iso 5% Blut									
	ATCC 43504	42,65	2,59	2,63	1,15	2,16	8,11	31,27	5,30
	ATCC 700392	41,36	2,41	2,89	1,26	1,20	7,07	33,33	5,07
	ATCC 51932	43,32	2,38	2,65	1,31	0,98	7,25	32,30	3,04
	IMMi 576	40,16	2,45	2,48	1,44	10,21	6,48	29,20	4,79
	IMMi 583	42,03	2,75	3,26	1,50	3,85	6,39	31,97	4,74
IMMi 589	34,44	3,20	3,29	1,58	8,96	8,79	30,20	5,31	
Iso 10% Blut									
	ATCC 43504	45,31	2,71	2,33	1,21	1,71	8,15	30,57	5,04
	ATCC 700392	42,35	2,63	2,64	1,38	1,08	7,18	32,91	5,02
	ATCC 51932	46,04	2,69	2,82	1,25	0,45	7,35	32,37	3,66
	IMMi 576	41,80	2,75	2,19	1,59	8,80	7,21	28,11	4,66
	IMMi 583	43,49	3,01	3,04	1,85	3,69	6,80	30,02	4,70
IMMi 589	31,38	4,07	3,87	2,00	6,00	11,95	28,47	6,40	

Auf CM55-Agar nehmen mit steigender Blutkonzentration bei einigen Stämmen der Palmitinsäure-, der Ölsäure- sowie der Stearinsäureanteil leicht zu. Eine weitere tendenzielle Veränderung zeigt sich bei der Methylenoctadecansäure. Deren Anteile nehmen bei einigen Stämmen mit ansteigendem Blutgehalt im Nährmedium ab. Bei dem frischisolierten Stamm IMMi 589 zeigt sich ein deutlicher Abfall des Octadecensäurekomplexes mit zunehmendem Blutgehalt im Nährboden.



Nach Kultur auf Isosensitest-Agar nehmen ebenfalls bei einigen Stämmen die Anteile der Palmitinsäure, der Ölsäure sowie der Stearinsäure mit ansteigender Blutkonzentration im Nährmedium leicht zu. Eine leicht sinkende Tendenz weisen die Anteile der 3-Hydroxypalmitinsäure auf. Erneut zeigt sich auch hier für den frischisolierten Stamm IMMi 589 ein deutlicher Abfall des Octadecensäurekomplexanteils mit zunehmendem Blutgehalt im Nährboden.

Bemerkenswerter Weise sind die drei einzigen Fettsäuren im Fettsäuremuster von *H. pylori*, die mit zunehmendem Blutgehalt im Nährmedium einen Anstieg ihrer Anteile aufweisen, diejenigen Fettsäuren, die auch in unbeimpften Blutmedien zu finden sind. *H. pylori* scheint diese Fettsäuren aus dem Nährboden aufzunehmen.

Insgesamt zeigen sich kaum Veränderungen im Fettsäuremuster von *H. pylori* in Abhängigkeit vom Blutgehalt im Nährmedium. Es sind lediglich Tendenzen im Gehalt verschiedener Fettsäuren auszumachen.

Bei der Betrachtung des Fettsäuremusters der verschiedenen *H. pylori*-Stämme nach Kultur auf bluthaltigen CM55- und Isosensitest-Medien fällt weiterhin auf, dass der Wert des Octadecensäurekomplexes bei den frischisolierten (IMMi) Stämmen deutlich höher ist, als bei den laboradaptierten (ATCC) Stämmen. Zusätzlich zeigt sich, dass die oben beschriebenen Tendenzen hauptsächlich durch frischisolierte Stämme entstehen. Es bestehen also Unterschiede im Fettsäuremuster zwischen frischisolierten und laboradaptierten *H. pylori*-Stämmen. Tabelle 13 stellt die durchschnittlichen Fettsäuremuster frischisolierter (IMMi) und laboradaptierter (ATCC) *H. pylori*-Stämme gegenüber.

**Tabelle 13:** Durchschnittliches Fettsäuremuster der *H. pylori*-Stammgruppen IMMi und ATCC nach Kultur auf Isosensitest- und CM55-Medien mit ansteigender Blutkonzentration

Nährmedium	Stämme	Fettsäure in % (Standardabweichung)							
		14:00	16:00	16:0 3OH	18:1 w9c	18:1-Kompl.	18:00	19:0 cyclo	18:0 3OH
CM55 2,5% Blut									
	IMMi	39,17 (±2,78)	3,06 (±0,65)	2,59 (±0,30)	1,95 (±0,56)	4,22 (±0,98)	8,72 (±2,65)	32,33 (±1,55)	3,19 (±2,25)
	ATCC	43,68 (±2,58)	2,72 (±0,14)	2,85 (±0,50)	1,42 (±0,13)	1,24 (±0,26)	7,09 (±0,65)	33,28 (±3,08)	4,72 (±0,88)
CM55 5% Blut									
	IMMi	40,33 (±6,25)	3,36 (±0,85)	2,61 (±0,34)	1,97 (±0,65)	3,66 (±0,55)	9,63 (±3,54)	30,59 (±3,44)	4,64 (±0,69)
	ATCC	43,85 (±2,85)	2,78 (±0,23)	2,58 (±0,48)	1,69 (±0,22)	1,27 (±0,20)	7,88 (±0,30)	32,21 (±3,59)	4,41 (±0,92)
CM55 10% Blut									
	IMMi	37,91 (±8,63)	3,70 (±0,79)	3,09 (±1,50)	2,21 (±0,54)	4,12 (±1,63)	11,11 (±3,35)	28,96 (±4,13)	5,50 (±2,75)
	ATCC	44,86 (±2,23)	3,13 (±0,13)	2,77 (±0,51)	1,84 (±0,04)	1,24 (±0,51)	8,19 (±0,48)	29,75 (±2,55)	4,58 (±1,03)
Iso 2,5% Blut									
	IMMi	39,17 (±2,21)	2,66 (±0,22)	3,26 (±0,28)	1,24 (±0,09)	8,27 (±3,18)	5,91 (±0,68)	30,10 (±1,14)	4,94 (±0,18)
	ATCC	42,13 (±1,22)	2,53 (±0,17)	3,16 (±0,23)	1,07 (±0,04)	1,54 (±0,56)	7,42 (±0,64)	33,29 (±1,05)	4,16 (±1,12)
Iso 5% Blut									
	IMMi	38,88 (±3,23)	2,80 (±0,31)	3,01 (±0,37)	1,50 (±0,06)	7,67 (±2,75)	7,22 (±1,11)	30,46 (±1,15)	4,94 (±0,26)
	ATCC	42,44 (±0,81)	2,46 (±0,09)	2,72 (±0,12)	1,24 (±0,07)	1,45 (±0,51)	7,48 (±0,45)	32,30 (±0,84)	4,47 (±1,02)
Iso 10% Blut									
	IMMi	38,89 (±5,35)	3,27 (±0,57)	3,03 (±0,69)	1,81 (±0,17)	6,16 (±2,09)	8,65 (±2,33)	28,86 (±0,83)	5,25 (±0,81)
	ATCC	44,57 (±1,60)	2,68 (±0,03)	2,59 (±0,20)	1,28 (±0,07)	1,08 (±0,51)	7,56 (±0,42)	31,95 (±1,00)	4,57 (±0,64)

Aus Tabelle 13 ist ersichtlich, dass frischisolierte und laboradaptierte *H. pylori*-Stämme nach Kultur auf bluthaltigen Nährmedien die gleichen Fettsäuren enthalten, deren Anteile am Fettsäuremuster jedoch unterschiedlich sein können.

Die frischisolierten Stämme weisen durchweg höhere Anteile an Palmitinsäure (16:0), Ölsäure (18:1ω9c) und Stearinsäure (18:0) auf als die laboradaptierten Stämme. Es stellt sich hier also die Frage, ob die frischisolierten Stämme möglicherweise mehr Fettsäuren aus dem Nährboden aufnehmen. Zumindest der Anteil der Stearinsäure steigt bei frischisolierten Stämmen mit zunehmendem Blutgehalt im Medium stärker an als bei den laboradaptierten Stämmen. Für Palmitinsäure und Ölsäure gilt diese Aussage nur für *H. pylori* nach Kultur auf Isosensitest-Blutmedien. Auf CM55-Blutmedien sind die Anstiege dieser Fettsäuren bei den beiden Stammgruppen vergleichbar. Der Anteil an Fettsäuren des Octadecensäurekomplexes (18:1-Komplex) liegt ebenfalls bei frischisolierten *H. pylori*-Stämmen höher als bei laboradaptierten Stämmen. Im Gegenzug dazu liegen aber die Anteile der Myristinsäure (14:0) und Methylenoctadecensäure (19:0 cyclo) durchgehend unterhalb derer der laboradaptierten Stämme.

Nach Kultur von *H. pylori* auf abluminhaltigen Nährmedien ist keine Ölsäure im Fettsäuremuster enthalten. Die durchschnittlichen Anteile der sieben nachgewiesenen Fettsäuren und ihre Anteile in Prozent am gesamtzellulären Fettsäuremuster von *H. pylori*

nach Kultur auf CM55- und Isosensitest-Nährmedien mit ansteigender Albuminkonzentration sind in Tabelle 14 aufgeführt.

**Tabelle 14:** Durchschnittliches Fettsäuremuster verschiedener *H. pylori*-Stämme nach Kultur auf CM55- und Isosensitest-Medien mit ansteigender Albuminkonzentration

Nährmedium		Anteil der Fettsäure in %						
	Stamm	14:0	16:0	16:0 3OH	18:1-Komplex	18:0	19:0 cyclo	18:0 3OH
<b>CM55 0,1% Albumin</b>								
	ATCC 43504	51,30	1,36	2,23	1,92	4,50	30,70	4,36
	ATCC 700392	42,90	1,29	3,14	0,89	5,01	42,14	2,79
	ATCC 51932	47,48	1,04	2,76	3,14	3,94	35,57	3,23
	IMMi 576	42,34	1,44	3,04	10,49	4,50	30,77	5,16
	IMMi 583	42,18	1,21	2,55	9,41	4,65	28,19	4,11
	IMMi 589	32,60	1,47	2,96	9,30	6,07	33,97	5,39
<b>CM55 0,5% Albumin</b>								
	ATCC 43504	51,55	1,25	1,89	2,32	4,18	31,27	4,28
	ATCC 700392	42,24	1,18	2,82	0,74	5,07	40,39	5,89
	ATCC 51932	47,78	1,02	2,54	2,60	3,72	36,45	3,25
	IMMi 576	40,80	1,17	2,68	10,70	4,69	29,94	5,36
	IMMi 583	44,52	1,22	2,48	8,75	4,41	29,39	4,20
	IMMi 589	33,69	1,43	3,22	7,12	6,96	34,59	6,77
<b>CM55 1% Albumin</b>								
	ATCC 43504	50,18	1,30	1,71	1,05	4,84	31,48	3,96
	ATCC 700392	43,52	1,12	2,84	1,07	5,07	38,24	5,62
	ATCC 51932	48,37	1,01	2,54	1,32	4,25	36,39	3,48
	IMMi 576	42,87	1,26	2,52	3,60	4,86	38,43	5,16
	IMMi 583	46,74	1,09	2,50	2,88	5,10	33,06	4,29
	IMMi 589	32,84	1,30	3,23	4,43	7,13	34,56	6,49
<b>Iso 0,1% Albumin</b>								
	ATCC 43504	49,00	1,76	3,80	5,84	5,34	26,11	4,72
	ATCC 700392	44,54	1,50	3,13	2,19	5,52	35,88	5,17
	ATCC 51932	47,14	1,26	2,27	1,20	4,56	34,40	3,21
	IMMi 576	45,38	1,73	2,64	9,33	4,53	28,91	4,10
	IMMi 583	44,33	1,51	3,40	4,89	4,88	32,08	4,82
	IMMi 589	37,37	2,09	3,39	11,98	5,45	30,17	5,10
<b>Iso 0,5% Albumin</b>								
	ATCC 43504	45,90	2,29	1,80	6,19	6,16	30,62	4,11
	ATCC 700392	49,01	0,87	2,22	1,63	3,55	32,73	4,44
	ATCC 51932	50,34	1,21	2,41	3,97	3,82	31,32	3,33
	IMMi 576	50,28	1,43	2,17	9,31	3,75	26,23	4,41
	IMMi 583	46,76	1,07	2,65	5,36	4,52	32,55	4,55
	IMMi 589	38,05	1,55	3,12	9,41	5,68	33,53	4,92
<b>Iso 1% Albumin</b>								
	ATCC 43504	48,43	1,81	1,58	2,87	5,77	31,62	4,19
	ATCC 700392	49,13	0,91	2,17	1,55	3,88	33,06	4,60
	ATCC 51932	52,32	1,24	2,34	2,88	3,82	31,01	3,06
	IMMi 576	50,40	1,39	1,91	5,56	4,04	29,79	4,21
	IMMi 583	49,01	1,14	2,50	4,94	4,39	31,44	4,26
	IMMi 589	35,46	1,71	3,29	6,53	7,24	34,82	5,70

In Abhängigkeit vom Albumingehalt im Nährmedium zeigen sich ebenfalls kaum Veränderungen im Fettsäuremuster von *H. pylori*.

Nach Kultur auf CM55-Albuminmedien ist die einzige deutlich sichtbare Veränderung ein Abfall des Gehalts an Fettsäuren des Octadecensäurekomplexes mit zunehmendem

Albumingehalt bei den drei frischisolierten Stämmen IMMi 576, IMMi 583 und IMMi 589. Es fällt zusätzlich auf, dass diese drei Stämme einen deutlich höheren Gehalt an Fettsäuren des Octadecensäurekomplexes aufweisen als die drei laboradaptierten Stämme, was bereits auf bluthaltigen Nährböden beobachtet werden konnte.

Nach Kultur auf Isosenistest-Albuminmedien findet sich ebenfalls, wie auf bluthaltigen Medien, ein höherer Gehalt an Fettsäuren des Octadecensäurekomplexes bei den drei frischisolierten *H. pylori*-Stämmen gegenüber den laboradaptierten Stämmen. Der Anteil des Octadecensäurekomplexes am Fettsäuremuster der Stämme IMMi 576 und IMMi 589 fiel mit zunehmendem Albumingehalt im Nährboden. Des Weiteren zeigt sich mit zunehmendem Albumingehalt eine leichte tendenzielle Steigerung des Gehalts an Myristinsäure bei vier der sechs untersuchten Stämme.

Um die gefundenen Veränderungen zwischen frischisolierten und laboradaptierten *H. pylori*-Stämmen genauer zu betrachten, stellt Tabelle 15 die durchschnittlichen Fettsäuremuster der beiden Stammgruppen nach Kultur auf Nährmedien mit ansteigender Albuminkonzentration gegenüber.

**Tabelle 15:** Durchschnittliches Fettsäuremuster der *H. pylori*-Gruppen ATCC und IMMi nach Kultur auf Isosensitest- und CM55-Medien mit ansteigender Albuminkonzentration

Nährmedien	Stämme	Fettsäure in % (Standardabweichung)						
		14:00	16:00	16:0 3OH	18:1-Kompl.	18:00	19:0 cyclo	18:0 3OH
CM55 0,1% Alb								
	IMMi	39,04 (±4,59)	1,37 (±0,12)	2,85 (±0,22)	9,73 (±0,54)	5,07 (±0,71)	30,98 (±2,36)	4,89 (±0,56)
	ATCC	47,22 (±3,43)	1,23 (±0,14)	2,71 (±0,37)	1,98 (±0,92)	4,48 (±0,44)	36,14 (±4,69)	3,46 (±0,66)
CM55 0,5% Alb								
	IMMi	39,67 (±4,49)	1,27 (±0,11)	2,79 (±0,31)	8,85 (±1,47)	5,35 (±1,14)	31,30 (±2,33)	5,44 (±1,05)
	ATCC	47,19 (±3,82)	1,15 (±0,10)	2,41 (±0,39)	1,88 (±0,82)	4,32 (±0, 56)	36,04 (±3,73)	4,47 (±1,09)
CM55 1,0% Alb								
	IMMi	40,82 (±5,86)	1,22 (±0,09)	2,75 (±0,34)	3,64 (±0,63)	5,70 (±1,02)	35,35 (±2,26)	5,31 (±0,91)
	ATCC	47,36 (±2,81)	1,14 (±0,12)	2,36 (±0,48)	1,15 (±0,12)	4,72 (±0,34)	35,37 (±2,85)	4,35 (±0,91)
Iso 0,1% Alb								
	IMMi	42,36 (±3,56)	1,78 (±0,24)	3,14 (±0,35)	8,73 (±2,92)	4,95 (±0,38)	30,38 (±1,30)	4,67 (±0,42)
	ATCC	46,89 (±1,83)	1,51 (±0,20)	3,07 (±0,63)	3,08 (±2,00)	5,14 (±0,42)	32,13 (±4,30)	4,37 (±0,84)
Iso 0,5% Alb								
	IMMi	45,03 (±5,14)	1,35 (±0,20)	2,65 (±0,39)	8,03 (±1,89)	4,65 (±0,79)	30,77 (±3,24)	4,62 (±0,22)
	ATCC	48,42 (±1,86)	1,45 (±0,60)	2,14 (±0,26)	3,93 (±1,86)	4,51 (±1,17)	31,56 (±0,88)	3,96 (±0,47)
Iso 1,0% Alb								
	IMMi	44,96 (±6,74)	1,41 (±0,23)	2,57 (±0,57)	5,68 (±0,65)	5,22 (±1,43)	32,02 (±2,09)	4,72 (±0,69)
	ATCC	49,96 (±1,69)	1,32 (±0,37)	2,03 (±0,32)	2,43 (±0,62)	4,49 (±0,90)	31,90 (±0,86)	3,95 (±0,65)

Tabelle 15 zeigt, dass laboradaptierte und frischisolierte *H. pylori*-Stämme nach Kultur auf albuminhaltigen Nährmedien die gleichen Fettsäuren enthalten, deren durchschnittliche Anteile am Fettsäuremuster aber Unterschiede aufweisen. So enthalten die frischisolierten Stämme im Durchschnitt einen etwa zwei- bis fünfmal höheren Anteil an Fettsäuren des Octadecensäurekomplexes als die laboradaptierten Stämme. Im Gegensatz dazu liegt der Anteil an Myristinsäure bei den frischisolierten Stämmen deutlich um etwa drei bis acht Prozentpunkte unter dem Anteil bei den laboradaptierten Stämmen. Bei Albuminkonzentrationen von 0,1% und 0,5% in CM55-Medien weisen die frischisolierten Stämme zusätzlich einen niedrigeren Gehalt an Methylenoctadecansäure auf.

Das Fettsäuremuster von *H. pylori* wird also durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Es zeigen sich Unterschiede im Fettsäuremuster der frischisolierten gegenüber dem der laboradaptierten Stämme, was einen Einfluss der Passagegeschichte auf das Fettsäuremuster von *H. pylori* zeigt. Einen deutlichen Einfluss auf das Fettsäuremuster nimmt auch das Grundsubstrat des verwendeten Nährmediums. Zusätzlich wird ein Einfluss des Nährbodensupplements auf das Fettsäuremuster von *H. pylori* beobachtet.

In Tabelle 16 werden deshalb die Fettsäuremuster der gesamten sechs verwendeten *H. pylori*-Stämme nach Kultur auf Isosensitest-Blutmedien, Isosensitest-Albuminmedien, CM55-Blutmedien und CM55-Albuminmedien gemittelt und die Ergebnisse für die vier Nährmedienzusammensetzungen gegenübergestellt. Zur Kultur wurden hier jeweils Medien mit Blutkonzentrationen von 1-10% und Albuminkonzentrationen von 0,05-1% verwendet.

Zusätzlich werden in Tabelle 16 die durchschnittlichen Fettsäuremuster der beiden *H. pylori*-Stammgruppen IMMi und ATCC nach Kultur auf den vier verschiedenen Nährmedienzusammensetzungen jeweils separat aufgeführt.

**Tabelle 16:** Durchschnittliche Fettsäureverteilung mit Variationskoeffizient V von *H. pylori* gesamt sowie der beiden Stammgruppen frischisolierte (IMMi) und laboradaptierte (ATCC) Stämme einzeln am sechsten Kulturtag, auf vier verschiedenen Medien, unabhängig von der Konzentration des Zusatzes

	Anteil der Fettsäure (FS) in %						Variationskoeffizient (V)					
	Nährboden											
Fettsäure	CM55A						CM55B					
	gesamt		IMMi		ATCC		gesamt		IMMi		ATCC	
	FS [%]	V	FS [%]	V	FS [%]	V	FS [%]	V	FS [%]	V	FS [%]	V
14:0	43,55	0,13	39,84	0,13	47,25	0,07	41,63	0,13	39,14	0,16	44,13	0,06
16:0	1,23	0,11	1,29	0,09	1,17	0,11	3,12	0,21	3,37	0,24	2,87	0,09
16:0 3OH	2,65	0,15	2,80	0,11	2,50	0,18	2,75	0,27	2,77	0,34	2,73	0,19
18:1 w9c	0		0		0		1,84	0,27	2,04	0,29	1,65	0,14
18:1-Kompl.	4,54	0,78	7,41	0,39	1,67	0,49	2,62	0,62	4,00	0,29	1,25	0,28
18:0	4,94	0,18	5,37	0,19	4,51	0,19	8,77	0,30	9,82	0,34	7,72	0,09
19:0 cyclo	34,19	0,11	32,54	0,09	35,85	0,11	31,19	0,11	30,62	0,11	31,75	0,11
18:0 3OH	4,65	0,24	5,21	0,17	4,09	0,25	4,51	0,39	4,44	0,51	4,57	0,21
Fettsäure	Iso A						Iso B					
	gesamt		IMMi		ATCC		gesamt		IMMi		ATCC	
	FS [%]	V	FS [%]	V	FS [%]	V	FS [%]	V	FS [%]	V	FS [%]	V
14:0	46,27	0,10	44,11	0,12	48,42	0,04	41,01	0,09	38,98	0,10	43,05	0,04
16:0	1,47	0,25	1,51	0,19	1,43	0,30	2,73	0,14	2,91	0,16	2,55	0,05
16:0 3OH	2,60	0,23	2,78	0,18	2,41	0,27	2,96	0,15	3,10	0,16	2,82	0,11
18:1 w9c	0		0		0		1,36	0,19	1,52	0,17	1,20	0,09
18:1-Kompl.	5,31	0,57	7,48	0,32	3,15	0,55	4,36	0,83	7,37	0,39	1,36	0,42
18:0	4,82	0,20	4,94	0,20	4,71	0,20	7,37	0,19	7,26	0,26	7,48	0,07
19:0 cyclo	31,46	0,08	31,06	0,08	31,86	0,08	31,16	0,06	29,81	0,04	32,51	0,03
18:0 3OH	4,38	0,15	4,67	0,10	4,09	0,17	4,72	0,18	5,05	0,10	4,40	0,22

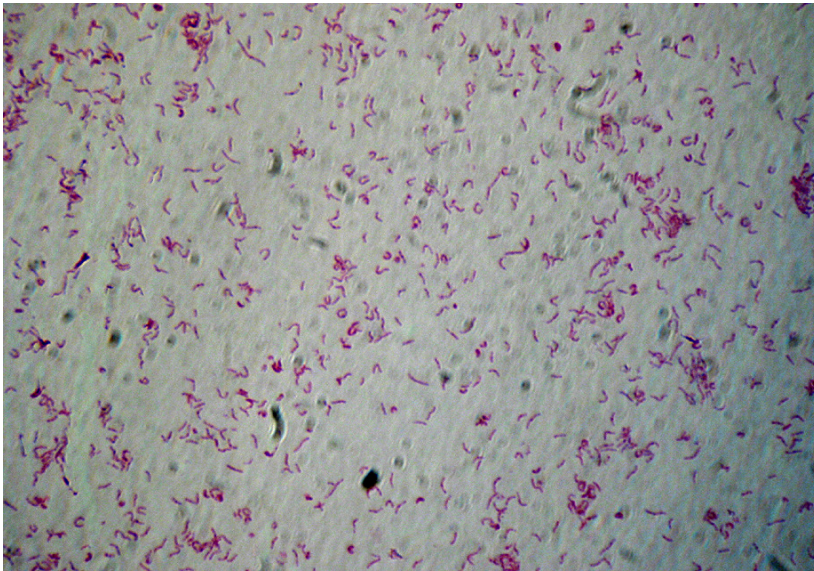
Nach Kultur von *H. pylori* auf bluthaltigen Nährmedien liegen die Anteile an Palmitinsäure (16:0) und Stearinsäure (18:0) bei beiden Stammgruppen höher als nach Kultur auf albuminhaltigen, also blutfreien Medien. Insbesondere enthält *H. pylori* nach Kultur auf albuminhaltigen Nährmedien keine Ölsäure. Diese Verteilung spricht dafür, dass von *H. pylori* Palmitinsäure (16:0) und Stearinsäure (18:0) zumindest anteilig und Ölsäure (18:1 ω9c) ausschließlich aus dem Blutsupplement im Nährmedium aufgenommen werden. Da die Anteile dieser drei Fettsäuren nach Kultur auf bluthaltigen Medien bei den frischisolierten Stämmen höher liegen als bei den laboradaptierten, nehmen die frischisolierten Stämme vermutlich mehr Fettsäuren aus dem Nährboden auf als die laboradaptierten. Zusätzlich nehmen die frischisolierten Stämme von CM55-Blutmedien höhere Anteile an Palmitinsäure (16:0), Ölsäure (18:1 ω9c) und Stearinsäure (18:0) auf als von Isosensitest-Blutmedien. Für die Aufnahme von Fettsäuren aus bluthaltigen Nährmedien durch *H. pylori* spielt offenbar das verwendete Grundsubstrat eine entscheidendere Rolle als die Konzentration des Blutsupplements im Medium (Tabelle 12, Tabelle 16).

Im Vergleich des Gesamtdurchschnitts der Fettsäuren des Octadecensäurekomplexes im Fettsäuremuster von *H. pylori* nach Kultur auf den verschiedenen Nährmedien fallen leicht erhöhte Anteile nach Kultur auf Isosensitest-Albuminmedien und leicht geringere Anteile nach Kultur auf CM55-Blutmedien auf. Bei genauer separater Betrachtung der Werte für die frischisolierten und laboradaptierten Stämme wird deutlich, dass die oben genannten Unterschiede im Gesamtdurchschnitt durch lediglich zwei Einzelwerte hervorgerufen werden. Bei den laboradaptierten Stämmen liegen die Anteile des Octadecensäurekomplexes nach Kultur auf Isosensitest-Albuminmedien deutlich oberhalb der Anteile des Octadecensäurekomplexes nach Kultur auf den drei weiteren Medien. Die Anteile des Octadecensäurekomplexes der frischisolierten Stämme liegen nach Kultur auf CM55-Blutmedien deutlich unterhalb derer nach Kultur auf den drei übrigen Medien.

## 4.5 Einfluss zunehmender Kulturdauer auf die Zellmorphologie und das Fettsäuremuster von *H. pylori*

### 4.5.1 Einfluss zunehmender Kulturdauer auf die Zellmorphologie von *H. pylori*

Die Kulturdauer hatte sowohl auf bluthaltigen als auch auf blutfreien Nährmedien einen Einfluss auf die Morphologie der *H. pylori*-Zellen. Am dritten Kulturtag waren bei allen Stämmen auf beiden Medien hauptsächlich Stäbchen und Bogenformen zu finden (Abb.2). Deren Verhältnis zueinander war unterschiedlich stark zugunsten der Stäbchen verschoben, lediglich bei dem frischisolierten Stamm IMMi 589 lagen mehr Bogen- als Stäbchenformen vor. Die Anzahl der Rundformen lag mit einzelnen Ausnahmen unterhalb von 20%.



**Abbildung 2:** Überwiegend Stäbchen und Bogenformen enthaltende Kultur des *H. pylori*-Stammes ATCC 43504 nach dreitägiger Inkubation auf einem Isosensitest-5%-Blutmedium (1000-fache Vergrößerung).

Tabelle 17 stellt die Anteile der Wuchsformen der verschiedenen Stämme auf Isosensitest-0,5%-Albuminmedien und Isosensitest-5%-Blutmedien im Kulturverlauf dar. Zwischen den vier verwendeten *H. pylori*-Stämmen zeigen sich hier zum Teil große Unterschiede.



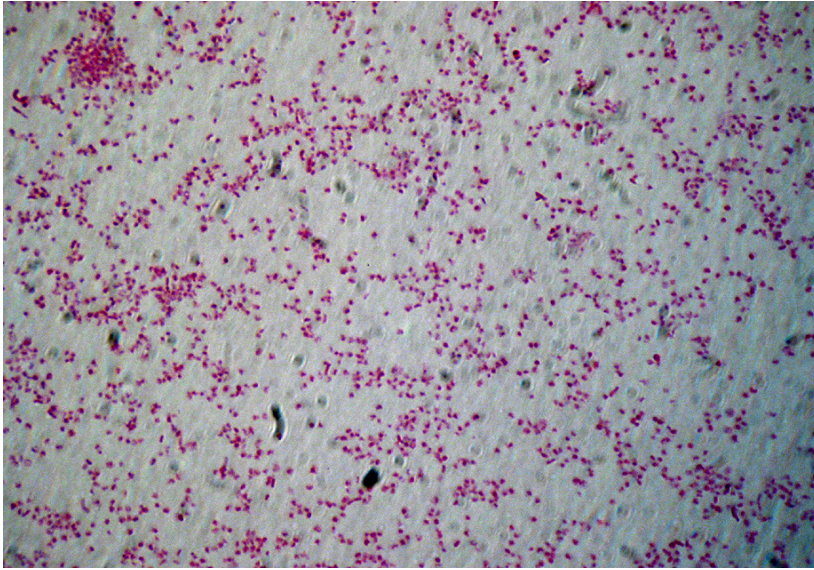
**Tabelle 17:** Verteilung der Wuchsformen von *H. pylori* an unterschiedlichen Inkubationstagen nach Kultur auf albuminhaltigen und bluthaltigen Isosensitest-Medien

Kulturalter	Stamm	Nährmedium					
		Isosensitest mit 0,5% Albumin			Isosensitest mit 5% Blut		
		Stäbchen	Bogen	Rundformen	Stäbchen	Bogen	Rundformen
3 Tage	ATCC 43504	52	40	8	59	33	8
		46	46	8	55	35	10
	ATCC 700392	48	30	22	37	41	22
		42	37	21	49	39	12
	IMMi 576	66	28	6	39	34	27
		56	40	4	59	34	7
	IMMi 589	35	50	15	52	46	2
		26	57	17	59	36	5
4 Tage	ATCC 43504	47	23	30	45	27	28
		33	41	26	43	21	36
	ATCC 700392	16	38	46	29	50	21
		17	38	45	22	57	21
	IMMi 576	9	16	75	51	22	27
		11	14	75	46	21	33
	IMMi 589	23	64	13	52	44	4
		23	65	12	64	34	2
5 Tage	ATCC 43504	38	18	44	39	23	38
		19	15	66	31	24	45
	ATCC 700392	18	52	30	29	26	45
		34	34	32	35	33	32
	IMMi 576	6	6	88	32	33	35
		7	6	87	44	38	18
	IMMi 589	23	68	9	35	64	1
		24	66	10	34	65	1
6 Tage	ATCC 43504	14	21	65	30	21	49
		15	17	68	28	27	45
	ATCC 700392	19	15	66	45	40	15
		21	12	67	43	43	14
	IMMi 576	4	15	81	56	15	29
		3	14	83	46	18	36
	IMMi 589	14	58	28	45	53	2
		21	61	18	37	60	3
11 Tage	ATCC 43504	13	30	57	32	32	36
		7	18	75	34	33	33
	ATCC 700392	5	18	77	39	40	21
		19	21	60	42	41	17
	IMMi 576	9	3	88	32	37	31
		1	7	92	27	33	40
	IMMi 589	21	64	15	49	49	2
		17	66	17	39	60	1

Die Zellformen aller vier *H. pylori*-Stämme wurden auf beiden Nährmedien von der Kulturdauer beeinflusst, jedoch bei jedem Stamm unterschiedlich. Gewisse Gemeinsamkeiten lassen sich für die Kulturen der Stämme ATCC 43504, ATCC 700392 und IMMi 576 auf Albuminagar im Gegensatz zu deren Kulturen auf Blutagar ausmachen.

Auf Albuminagar erfolgte für diese drei Stämme im Verlauf der Kulturdauer eine deutliche Rundformbildung, so dass am elften Kulturtag 57-92% der Zellen als Rundformen vorlagen (Abb. 3). Diese Zellform bildete am dritten Kulturtag den geringsten Anteil. Das

Verhältnis zwischen Stäbchen- und Bogenformen verschob sich bei den beiden laboradaptierten Stämmen im Kulturverlauf zugunsten der Bogenformen, die am elften Kulturtag mit 18-30% die Stäbchen (5-19%) überwogen. Bei dem frischisolierten Stamm IMMi 576 mit dem am elften Kulturtag höchsten Rundformanteil glich sich das Verhältnis von Stäbchen- und Bogenformen im Kulturverlauf aus, 1-9% der Zellen lagen am Ende der Kultur in einer der beiden Formen vor.



**Abbildung 3: Überwiegend Rundformen enthaltende Kultur des *H. pylori*-Stammes IMMi 576 nach elftägiger Inkubation auf einem Isosensitest-0,5%-Albuminmedium (1000-fache Vergrößerung).**

Auf Blutagar lagen bei den Stämmen ATCC 43504, ATCC 700392 und IMMi 576 am elften Kulturtag nur 17-40% der Zellen als Rundformen vor, also deutlich weniger als auf Albuminagar. Insgesamt haben sich bei diesen drei Stämmen die Anteile der verschiedenen Wuchsformen im Kulturverlauf einander angeglichen und hielten sich am elften Kulturtag die Waage. Lediglich bei dem laboradaptierten Stamm ATCC 700392 wiesen die Rundformen mit 17-21% einen etwas geringeren Anteil auf als die beiden anderen beschriebenen Wuchsformen, die beide mit 39-42% auftraten.

Der frischisolierte *H. pylori*-Stamm IMMi 589 nahm auf beiden Nährmedien eine Sonderstellung ein. Er unterschied sich hinsichtlich der Verhältnisse der Wuchsformen z. T. stark von den drei anderen Stämmen, vor allem durch eine deutlich geringere Rundformbildung auf beiden verwendeten Nährmedien.

IMMi 589 zeigte nach vier Tagen Kultur auf Albuminagar einen deutlich geringeren Anteil an Rundformen als die drei übrigen Stämme. Der Anteil der Rundformen überstieg nur in einem Fall, am sechsten Kulturtag, eine Grenze von 20%. Hier lag der Anteil der Rundformen bei 28% und damit immer noch weit unter den Anteilen bei den übrigen Stämmen zu diesem Zeitpunkt der Kultur. Das Verhältnis der Stäbchen- und Bogenformen zueinander verschob sich leicht zugunsten der Bogenformen. Der Anteil der Rundformen blieb mit Ausnahme des sechsten Tages der Niedrigste.

Ab dem vierten Kulturtag auf Blutagar zeigte IMMi 589 einen deutlich geringeren Anteil an Rundformen als die drei übrigen Stämme. Der maximale Anteil lag hier bei 5%. Zwischen dem vierten und dem fünften Tag verschoben sich die Anteile der Stäbchen und Bogenformen von IMMi 589 zueinander. Der Anteil der Rundformen wurde dabei nicht beeinflusst. Dieser lag durchgehend zwischen 1% und 5% und stellte damit den geringsten Anteil. Am dritten und vierten Kulturtag überwog der Stäbchenanteil den Bogenformanteil deutlich. Dieses Verhältnis kehrte sich zum fünften Tag hin um und es erfolgte wie bei den anderen Stämmen eine Annäherung bis zum elften Kulturtag.

#### 4.5.2 Einfluss zunehmender Kulturdauer auf das Fettsäuremuster von *H. pylori*

Abhängig vom Nährbodensupplement zeigen sich unterschiedliche Veränderungen im Fettsäuremuster von *H. pylori* mit zunehmender Kulturdauer.

Die prozentualen Anteile der gefundenen Fettsäuren am Gesamtfettsäuremuster von *H. pylori* vom dritten bis zum sechsten sowie am elften Tag nach Kultur auf Isosenistest-0,5%-Albuminagar listet Tabelle 18 auf.

Auf albuminsupplementiertem Agar zeigen sich mit zunehmender Kulturdauer kaum Veränderungen des Fettsäuremusters der *H. pylori*-Stämme ATCC 43504, ATCC 700392 und IMMi 576. Bei dem Stamm IMMi 589 hatte die Kulturdauer einen leichten Einfluss auf einzelne Fettsäuren. Die Anteile der Myristinsäure (14:0) als eine der Hauptfettsäuren sanken im Kulturverlauf um etwa sieben Prozentpunkte ab. Im Gegensatz dazu stiegen die prozentualen Anteile der Stearinsäure (18:0) und der 3-Hydroxypalmitinsäure (16:0 3OH) um wenige Prozentpunkte an (Tabelle 18).

Größere Veränderungen zeigten sich auf blutsupplementierten Medien im Verlauf der Kultur vom dritten bis zum elften Inkubationstag. Tabelle 19 zeigt die prozentualen Anteile der gefundenen Fettsäuren am Gesamtfettsäuremuster von *H. pylori* vom dritten bis zum sechsten sowie am elften Tag nach Kultur auf Isosenistest-5%-Blutagar.

Auf Blutagar sanken mit zunehmender Kulturdauer die Anteile der Myristinsäure (14:0) bei allen vier Stämmen ab; leicht bei ATCC 43504 und IMMi 576 und deutlich bei ATCC 700392 und IMMi 589. Die drei Fettsäuren Palmitinsäure (16:0), Ölsäure (18:1 $\omega$ 9c) und Stearinsäure (18:0), die vermutlich von *H. pylori* aus dem Blut aufgenommen werden können, wiesen steigende Anteile am Fettsäuremuster mit fortschreitender Kulturdauer auf. Der Palmitinsäureanteil am Fettsäuremuster nahm vom dritten bis zum elften Kulturtag bei den laboradaptierten Stämmen minimal zu, deutlicher bei den frischisolierten Stämmen. Der Anteil an Stearinsäure stieg bei ATCC 43504 und IMMi 576 leicht an, bei ATCC 700392 deutlicher. Bei IMMi 589 verdoppelte sich deren Anteil auf etwa 10%. Bei allen vier Stämmen stieg der Anteil der Ölsäure im Kulturverlauf stark an. Bei IMMi 589 verdreifachte sich der Wert, für die anderen drei Stämme fand man eine Verdopplung des Ölsäureanteils nach elf Kulturtagen.

Die Aufnahme von Fettsäuren aus bluthaltigen Nährmedien wird offensichtlich stärker durch die Dauer der Kultur als durch die Konzentration des Blutsupplementes im Nährmedium (4.4) beeinflusst.

**Tabelle 18:** Fettsäuremuster der vier *H. pylori*-Stämme nach Kultur auf Isosensitest-0,5%-Albuminagar im Kulturverlauf

ATCC 43504: Anteil der Fettsäure in %							
Kulturalter [d]	14:0	16:0	16:0 3OH	18:1-Kompl.	18:0	19:0 cyclo	18:0 3OH
3	49,39	1,51	1,73	5,44	6,00	29,20	3,03
	49,48	1,61	1,74	5,08	6,10	28,90	3,03
4	48,71	1,42	1,85	5,01	5,85	30,51	3,16
	49,43	1,48	1,90	4,54	5,60	30,39	3,16
5	48,66	1,44	2,12	3,04	5,56	31,23	4,87
	47,89	1,33	2,22	3,16	5,69	31,37	4,89
6	48,71	1,32	2,21	3,37	5,54	30,72	5,02
	47,66	1,36	2,10	3,24	5,74	31,38	5,07
11	47,40	1,38	2,00	3,13	5,81	31,60	4,73
	48,23	1,52	2,22	3,14	6,06	30,88	4,53
ATCC 700392: Anteil der Fettsäure in %							
Kulturalter [d]	14:0	16:0	16:0 3OH	18:1-Kompl.	18:0	19:0 cyclo	18:0 3OH
3	52,50	0,97	2,16	1,18	3,46	32,31	3,16
	52,78	1,09	2,13	1,14	3,41	31,84	3,30
4	52,12	1,12	2,13	1,32	3,44	32,20	3,49
	57,58	1,03	2,32	1,08	2,75	27,26	3,23
5	52,32	1,07	2,12	1,13	3,53	32,02	3,38
	50,30	1,00	2,07	1,04	3,80	33,79	3,49
6	49,48	1,14	1,97	1,13	3,99	34,73	3,14
	49,49	1,12	2,00	1,25	3,89	34,68	3,03
11	49,22	1,12	2,12	1,28	3,91	34,40	3,49
	52,02	1,13	2,21	1,18	3,41	31,80	3,46
IMMi 576: Anteil der Fettsäure in %							
Kulturalter [d]	14:0	16:0	16:0 3OH	18:1-Kompl.	18:0	19:0 cyclo	18:0 3OH
3	43,45	1,45	2,23	14,56	4,64	27,36	3,08
	43,38	1,25	2,16	14,39	4,62	27,63	3,21
4	44,32	1,17	1,82	11,08	4,69	30,91	3,18
	45,44	1,18	1,83	8,42	4,86	32,36	3,23
5	44,33	1,17	2,28	8,06	5,08	32,01	5,28
	44,11	1,14	2,39	8,58	5,02	31,77	5,05
6	43,36	1,13	2,28	10,56	5,02	30,50	5,06
	44,83	1,20	2,22	8,43	5,13	31,01	4,86
11	44,64	1,21	2,00	8,10	4,94	31,80	4,71
	44,47	1,25	1,92	8,06	5,05	31,69	4,88
IMMi 589: Anteil der Fettsäure in %							
Kulturalter [d]	14:0	16:0	16:0 3OH	18:1-Kompl.	18:0	19:0 cyclo	18:0 3OH
3	39,39	1,31	2,49	8,78	5,66	34,01	3,27
	38,86	1,32	2,80	8,65	5,62	33,93	4,43
4	37,55	1,37	2,97	8,42	5,89	34,66	4,82
	39,11	1,39	3,12	8,47	5,60	33,55	4,74
5	35,69	1,43	3,14	8,71	6,29	35,33	5,28
	34,15	1,42	3,15	9,19	6,49	36,00	5,13
6	34,42	1,48	2,94	8,42	6,77	36,32	5,06
	34,52	1,47	3,06	8,62	6,76	35,99	5,16
11	33,75	1,63	3,27	8,30	7,05	35,90	5,52
	32,75	1,62	3,26	8,06	7,48	36,38	5,73

**Tabelle 19:** Fettsäuremuster der vier *H. pylori*-Stämme nach Kultur auf Isosensitest-5%-Blutagar im Kulturverlauf

ATCC 43504: Anteil der Fettsäure in %								
Kulturalter [d]	14:0	16:0	16:0 3OH	18:1 w9c	18:1-Kompl.	18:0	19:0 cyclo	18:0 3OH
3	44,08	2,12	2,41	0,80	2,48	7,92	32,69	3,75
	44,00	2,14	2,34	0,77	2,38	7,96	32,99	3,87
4	44,68	2,18	2,15	0,81	2,23	7,84	32,33	3,76
	44,49	2,21	2,22	1,00	2,64	8,09	32,49	3,25
5	42,35	2,22	2,68	1,05	2,71	8,29	32,03	5,65
	42,38	2,17	2,72	1,12	2,66	8,37	32,22	5,61
6	42,72	2,41	2,75	1,26	2,46	8,22	31,40	5,38
	42,90	2,47	2,82	1,20	2,56	8,22	31,07	5,49
11	41,82	2,73	2,71	1,61	2,48	9,12	30,47	5,30
	41,43	2,73	2,68	1,66	2,58	9,52	30,58	5,35
ATCC 700392: Anteil der Fettsäure in %								
Kulturalter [d]	14:0	16:0	16:0 3OH	18:1 w9c	18:1-Kompl.	18:0	19:0 cyclo	18:0 3OH
3	51,06	2,27	2,74	0,73	1,43	4,17	29,08	3,46
	47,89	2,25	2,53	0,71	1,49	4,96	32,25	3,39
4	49,06	2,38	2,71	0,83	1,50	4,74	30,19	3,68
	46,51	2,33	2,54	0,84	1,59	5,32	32,48	3,53
5	44,50	2,38	2,36	0,99	1,62	6,08	33,67	3,80
	42,00	2,24	2,55	1,08	1,64	5,83	31,65	4,39
6	44,32	2,70	2,31	1,25	1,67	6,23	32,91	3,35
	45,13	2,61	2,58	0,85	0,84	6,13	33,33	3,79
11	41,83	2,94	2,54	1,56	1,64	7,44	33,50	3,80
	41,03	2,89	2,82	1,60	1,73	7,42	32,38	4,39
IMMi 576: Anteil der Fettsäure in %								
Kulturalter [d]	14:0	16:0	16:0 3OH	18:1 w9c	18:1-Kompl.	18:0	19:0 cyclo	18:0 3OH
3	39,47	2,09	2,69	1,01	9,05	6,58	32,04	3,85
	39,14	2,16	2,93	1,06	8,80	6,46	32,77	3,76
4	39,70	2,21	2,15	1,20	8,92	6,73	32,51	3,36
	38,82	2,20	3,09	1,34	8,38	6,37	31,45	5,18
5	37,79	2,29	2,86	1,48	8,34	6,99	31,66	5,36
	39,98	2,44	3,11	1,43	9,07	7,29	28,96	5,89
6	37,77	2,39	2,93	1,61	8,42	7,23	31,17	5,23
	38,82	2,51	2,86	1,58	8,42	6,69	30,97	5,06
11	37,39	2,80	2,87	2,08	8,57	7,70	30,31	5,13
	37,43	2,83	2,58	2,08	8,12	7,99	30,97	5,17
IMMi 589: Anteil der Fettsäure in %								
Kulturalter [d]	14:0	16:0	16:0 3OH	18:1 w9c	18:1-Kompl.	18:0	19:0 cyclo	18:0 3OH
3	39,17	2,26	2,82	0,82	11,66	5,82	28,86	4,14
	38,36	2,28	2,71	0,74	10,53	6,64	30,48	3,44
4	36,01	2,5	2,93	1,03	10,03	7,81	30,43	4,35
	36,06	2,54	2,98	1,08	9,46	7,74	30,91	4,51
5	35,08	2,70	3,16	1,33	9,45	8,45	29,79	4,83
	35,41	2,71	3,05	1,36	9,88	7,96	29,92	4,73
6	34,13	2,98	3,10	1,70	9,34	8,94	29,79	4,95
	33,67	2,90	3,23	1,56	9,39	9,13	29,66	5,35
11	31,87	3,39	3,45	2,36	9,06	10,35	28,96	5,55
	31,89	3,49	3,40	2,38	8,77	10,61	29,11	5,55

#### 4.5.3 Vergleich der Änderungen von Zellmorphologie und Fettsäuremuster von *H. pylori* mit zunehmender Kulturdauer

Bei Kultur von *H. pylori* auf Isosensitest-0,5%-Albuminmedien ließen sich mit zunehmendem Alter der Kulturen deutliche Veränderungen der Zellmorphologie feststellen. Es erfolgte eine starke Rundformbildung. Demgegenüber fanden sich kaum Veränderungen im Fettsäuremuster dieser Kulturen.

Veränderungen im Fettsäuremuster finden sich mit zunehmendem Kulturalter bei *H. pylori* nach Inkubation auf Isosensitest-5%-Blutmedien, hier jedoch fehlt die extreme Rundformbildung. Der Anteil der Rundformen machte nach elf Kulturtagen ungefähr ein Drittel der Zellen aus.

Diese Ergebnisse zeigen, dass keine direkte Korrelation zwischen der Morphologie und dem Fettsäuremuster von *H. pylori* besteht. Die unterschiedlichen Wuchsformen von *H. pylori* nach Kultur auf Isosensitest-0,5%-Albuminmedien unterscheiden sich hinsichtlich ihres Fettsäuremusters nicht. Sowohl Kulturen mit weniger als 20% Rundformen als auch Kulturen mit bis zu 90% Rundformen haben nahezu identische Fettsäuremuster (Abb.7 und Abb. 8 im Anhang).

## 5 Diskussion

### 5.1 Einfluss der Nährmedienzusammensetzung auf das Wachstum und das Fettsäuremuster von *Helicobacter pylori*

Üblicherweise werden zur Kultur von *H. pylori* blutsupplementierte Nährmedien auf der Basis von organischen Zell- oder Fleischextrakten verwendet. Verschiedene Autoren beschreiben Blut als das Supplement in Medien aus verschiedenen Grundsubstraten, was zu bestmöglichem Wachstum führt (Goodwin, Blincow et al. 1985, Marshall et al. 1984, Walsh et al. 1997). Einige Autoren beschreiben auch Albumin als mögliches Supplement in Nährböden zur Kultivierung von *H. pylori* (Ansorg et al. 1992, Hazell et al. 1990, Reynolds et al. 1994, Scherer et al. 2003). In der vorliegenden Studie kann Albumin in ausreichenden Konzentrationen als Nährbodensupplement zur Kultur von *H. pylori* hinsichtlich Wachstumsgeschwindigkeit und -menge als gleichwertig gegenüber Blut als Nährbodensupplement beurteilt werden.

Große Unterschiede in der Kulturausbeute von *H. pylori* zeigten sich jedoch nach Kultur auf Medien aus den Grundsubstraten Fleischextrakt-Peptonagar (CM55) und Isosensitest. Medien aus dem Grundsubstrat Isosensitest führten regelmäßig zu einer mehr als dreifach so hohen Kulturausbeute gegenüber entsprechend supplementierten CM55-Medien. Hartzen et al. (1997) beschrieben ebenfalls ein günstigeres Wuchsverhalten von *H. pylori* auf Isosensitest-10%-Pferdeblutagar gegenüber Mueller-Hinton-10%-Pferdeblutagar. Welche Komponenten die Unterschiede im Wachstum von *H. pylori* beeinflussten, untersuchten sie nicht. Ob CM55-Medien Faktoren beinhalten, die *H. pylori* an einem reichhaltigen Wachstum hindern, oder ob Isosensitest-Medien mehr wachstumsfördernde Faktoren enthalten, die in CM55-Medien fehlen, ist unbekannt. Dass in der vorliegenden Studie auf unsupplementierten Nährböden kein messbares Wachstum erreicht werden konnte zeigt, dass erst die Kombination des Grundsubstrates mit einem Supplement das Wachstum ermöglicht. Die Kulturausbeute von Isosensitest-Albuminmedien ließ sich durch Erhöhung der Albuminkonzentration steigern, die Kulturausbeute von CM55-Medien hingegen blieb unverändert gering. Hieraus lässt sich der Schluss ziehen, dass das Nährmediengrundsubstrat CM55 Faktoren enthält, die im Isosensitest-Grundsubstrat nicht enthalten sind und die das Wachstum von *H. pylori* bremsen. Ein definierter Unterschied in der Rezeptur der hier verwendeten Grundsubstrate ist ein deutlich höherer Peptongehalt im



CM55-Agar gegenüber Isosensitest-Agar; es ist jedoch nicht bekannt, ob dies einen Einfluss auf das Wachstum von *H. pylori* nimmt.

Nach Kultur auf Nährböden aus dem Grundsubstrat CM55 erbrachten weiterhin die frischisolierten Stämme durchweg eine geringere Erntemenge als die laboradaptierten Stämme. Bedenkt man einen möglicherweise wachstumshemmenden Faktor für *H. pylori* im CM55-Grundsubstrat, dann ist der Grund für das bessere Wachstum der laboradaptierten Stämme möglicherweise eine erfolgte Adaption an die ungünstigen Bedingungen auf diesem Nährboden bzw. eine erfolgte Selektion derjenigen Kolonien, deren Wachstum nicht oder weniger stark gebremst wird, während die frischisolierten Stämme stärker in ihrem Wachstum gehemmt werden.

Bei den frischisolierten Stämmen konnte eine gesteigerte Aufnahme von Palmitinsäure (16:0), Ölsäure (18:1  $\omega$ 9c) und Stearinsäure (18:0) nach Kultur auf Blutmedien aus dem Grundsubstrat CM55 gegenüber Blutmedien aus dem Grundsubstrat Isosensitest beobachtet werden. Dabei ist unklar, ob in CM55-Medien die Fettsäuren besser verfügbar sind, von Isosensitest eventuell gebunden werden oder ob die frischisolierten Stämme, die auf CM55 ohnehin schlecht wachsen, in irgendeiner Weise verändert sind und ihre Zellwand besonders permeabel ist. Da die frischisolierten Stämme insgesamt mehr Fettsäuren aus den Medien aufnehmen, verfügen diese Stämme möglicherweise über einen aktiveren Fettsäurestoffwechsel als die laboradaptierten Stämme. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass gewisse Stoffwechselaktivitäten, speziell die Katalase- sowie die Ureaseaktivität mit zunehmender Passagehäufigkeit der Kulturen in vitro nachlassen oder verschwinden können (Goodwin, Armstrong, 1990). Es ist also denkbar, dass laboradaptierte, also häufig passagierte Stämme, insgesamt einen weniger aktiven Fettsäurestoffwechsel haben, was sich auch auf die Aufnahme von Fettsäuren aus dem Nährmedium auswirken würde.

Es existieren Untersuchungen des Fettsäuremusters von *H. pylori* nach Kultur auf bluthaltigen und albuminhaltigen Nährböden, in denen jedoch unterschiedliche Grundsubstrate verwendet wurden. Dabei konnten aber bereits deutliche Unterschiede im Fettsäuremuster von *H. pylori* nach Kultur auf verschiedenen Nährmedien einerseits und zwischen frischisolierten und laboradaptierten *H. pylori*-Stämmen andererseits gefunden werden (Scherer et al. 2003).

## 5.2 Die Zellmorphologie von *H. pylori*

*H. pylori*-Zellen durchlaufen im Zuge des Alterungsprozesses der Kulturen eine Konversion von stäbchenförmigen zu runden Zellformen (Catrenich et al. 1991, Sörberg et al. 1996, Benaissa et al. 1996). Der erste Schritt im Umwandlungsprozess ist eine stärkere Krümmung der sonst gewundenen *H. pylori*-Zelle. An der konkaven Seite dieser gekrümmten Zelle löst sich zunächst die Zellhülle vom Zytoplasma (Abb. 4a, 5a). Mit zunehmendem Alter verstärkt sich die Zellkrümmung und die Zellen nehmen innerhalb der gelösten Zellhülle eine U-Form an (Abb. 4b, 5b). Wenn die Zelle als komplette Rundform erscheint, hat sich entweder der innere Protoplasmazyylinder vollkommen zusammengefaltet (Abb. 4c, 4d) oder der leere Raum zwischen den beiden Schenkeln der U-förmigen Zellen, bei denen es auch zu einem Ringschluss kommen kann, ist mit homogenem Zytoplasma gefüllt (Abb. 5c, 5d). Während des gesamten Prozesses bleiben die Flagellen erhalten (Jones et al. 1990).



**Abb. 4:** Schemazeichnung der Rundformbildung von *H. pylori* durch Faltung des Protoplasmazyinders (in Anlehnung an Jones et al. 1990)



**Abb. 5:** Schemazeichnung der Rundformbildung von *H. pylori* durch Ringschluss der beiden Pole (in Anlehnung an Jones et al. 1990)

Rundformen von *H. pylori* werden allgemein als absterbende Zellen, z.T. aber auch als Dauerformen in ungünstigen Kulturverhältnissen angesehen (Bode et al. 1993, Kusters et al. 1997). Es ist bekannt, dass *H. pylori* durch widrige Kulturverhältnisse zur Rundformbildung angeregt werden kann (Bode et al. 1993). In neuerer Zeit wird vermutet,

dass Rundformen in *H. pylori*-Kulturen generell eine Mischung aus lebenden kultivierbaren Organismen mit lebenden nicht kultivierbaren sowie abgestorbenen Zellen darstellen (Saito et al. 2003, Sato et al. 2003). Neben den Kulturbedingungen, die die einzelnen Autoren verwendeten, waren auch die Zeitspannen, in denen sich *H. pylori* in Rundformen umwandelte, von Studie zu Studie verschieden. Alle Studien verwendeten jedoch jeweils nur ein Kulturmedium, so dass die Morphologie von *H. pylori* auf zwei verschiedenen Nährmedien unter sonst gleichen Kulturbedingungen bisher nicht verglichen wurde.

Die vorliegende Studie bestätigt, dass nicht allein die Kulturdauer, sondern durchaus auch das verwendete Nährmedium auf die Morphologie von *H. pylori* Einfluss nimmt. Bei sonst gleichen Kulturbedingungen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Morphologie einerseits unterschiedlich lange auf den gleichen Isosensitest-Medien inkubierte Kulturen und andererseits Kulturen, die gleichlang, aber auf unterschiedlich supplementierten Isosensitest-Medien inkubiert wurden.

Es fanden sich Unterschiede im Verlauf der Rundformbildung zwischen *H. pylori* nach Kultur auf bluthaltigen gegenüber blutfreien Isosensitest-Medien. Für drei der vier untersuchten Stämme kam es auf albuminhaltigen Medien im Verlauf der Kultur bis hin zum elften Inkubationstag zu einer massiven Rundformbildung von bis zu 92% der Zellen einer Kultur. Auf bluthaltigen Medien fand man zum Ende des Versuchs am elften Tag kaum mehr als ein Drittel Rundformen und deren Anteile blieben ab dem fünften Kulturtag relativ konstant. Eine mögliche Erklärung ist, dass die nachgewiesene Aufnahme von Fettsäuren, besonders der für *H. pylori* toxischen Ölsäure (18:1  $\omega$ 9c), bei der Kultur auf bluthaltigen Medien so weit reichende Strukturveränderungen in den Zellmembranen mit sich brachte, dass die Zellen nicht mehr in der Lage waren, Rundformen auszubilden, sondern ihre Lebensfähigkeit vorher verloren haben. Bei Kulturen, die auf Isosensitest-Albuminmedien kultiviert wurden, würde demnach eine morphologische Umwandlung zu Rundformen im Zuge des Alterungsprozesses, wie es von vielen Autoren beschrieben wird (Catrenich et al. 1991, Sörberg et al. 1996, Benaissa et al. 1996), stattgefunden haben.

In einer Studie über die Toxizität von Fettsäuren für *H. pylori* (Khulusi et al. 1995) wiesen Kontrollkulturen weniger als 10% Rundformen auf, wohingegen nach Zugabe von 2-5mM ungesättigter Fettsäuren in das Kulturmedium viele Rundformen zu beobachten waren. In

diesem Falle ging die Rundformbildung mit Zerstörung der Zellmembranen und kompletter Zell-Lyse einher. All diese morphologischen Untersuchungen wurden allerdings sehr früh im Kulturverlauf, nämlich bereits nach 48 Stunden Inkubation, gemacht. Auch die Fettsäurekonzentration war um vieles höher als in der vorliegenden Studie (Khulusi et al. 1995). Es bleibt also die Frage offen, ob in der beschriebenen Studie die Kontrollkulturen, die ohne Zugabe von Fettsäuren kultiviert wurden, bei längerer Kulturdauer auch Rundformen ausgebildet hätten, was zu vermuten ist. Die Anzahl der Rundformen in den Kontrollkulturen von Khulusi et al. (1995) korrelieren mit den Anteilen an Rundformen in der vorliegenden Studie am dritten Kulturtag.

Berücksichtigt man die Theorie verschiedener Forscher, dass es unterschiedliche Arten von Rundformen gibt, so liegen in der vorliegenden Studie möglicherweise nach elftägiger Kultur auf Isosensitest-Albuminmedien Dauerformen vor und nach Kultur auf Isosensitest-Blutmedien abgestorbene Zellen, wie sie auch von Khulusi et al. (1995) nach 48stündiger Kultur in Medien mit hohen Konzentrationen an toxischen Fettsäuren gefunden wurden. Da die Konzentrationen an toxischen Fettsäuren in der vorliegenden Studie deutlich geringer waren als in der Studie von Khulusi et al. (1995), waren auch die Effekte auf die *H. pylori*-Zellen geringer und ein geringerer Prozentsatz der *H. pylori*-Zellen lag als Rundformen vor.

Die Ursache des besonderen Verhaltens des frischisolierten Stammes IMMi 589, welcher kaum Rundformen auf albuminhaltigen und so gut wie keine auf bluthaltigen Medien ausbildete, dabei aber hohe Erntemengen vorwies - also offenbar gut gewachsen war - konnte im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden. Offensichtlich gibt es stammspezifische Unterschiede in der Rundformbildung.

Die größten morphologischen Veränderungen waren im Kulturverlauf auf Isosensitest-Albuminagar zu finden. Auf eben diesem Nährmedium waren im Kulturverlauf kaum Änderungen im Fettsäuremuster zu finden. Die Zellformen von *H. pylori* unterscheiden sich in ihrem Fettsäuremuster also offenbar nicht. Geis et al. (1990) verglichen das Fettsäuremuster der Phospholipide von *H. pylori*-Kulturen mit überwiegend spiraligen Zellen mit dem von Kulturen, die hauptsächlich Rundformen enthielten. Sie fanden dabei ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fettsäuremustern.

### 5.3 Das Fettsäuremuster von *H. pylori*

Verschiedene Autoren haben nachgewiesen, dass Bakterien in Nährmedien enthaltene Fettsäuren während der Kultur aufnehmen können (Khulusi et al. 1995, Scherer et al. 2003). Khulusi et al. (1995) beschrieben, dass die Menge der Aufnahme mit ansteigender Konzentration an Fettsäuren im Nährboden zunimmt. Bis zur Fettsäurebestimmung von *H. pylori* bebrüteten sie die Kulturen jedoch nur maximal 48 Stunden. Weiterhin existieren Untersuchungen des Fettsäuremusters von *H. pylori* nach Kultur auf bluthaltigen und albuminhaltigen Nährböden, in denen jedoch unterschiedliche Grundsubstrate verwendet wurden. Scherer et al. (2003) konnten in dieser Studie aber bereits deutliche Unterschiede im Fettsäuremuster von *H. pylori* nach Kultur auf verschiedenen Nährmedien einerseits und zwischen frischisolierten und laboradaptierten *H. pylori*-Stämmen andererseits beobachten. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Steigerung der Anteile der aus dem Nährmedium aufgenommenen Fettsäuren weniger von der Konzentration der Fettsäuren im Nährmedium, aber deutlich von der Kulturdauer auf dem entsprechenden Medium abhängt. Eine gesteigerte Kulturdauer auf bluthaltigen Medien führte zur Erhöhung der Anteile besonders der Ölsäure (18:1  $\omega$ 9c) im Fettsäuremuster von *H. pylori*. Wie auch Khulusi et al. (1995) und Scherer et al. (2003) beschrieben, wurden von *H. pylori* auch in der vorliegenden Untersuchung die verschiedenen Fettsäuren zu unterschiedlichen Anteilen aus den Nährmedien aufgenommen.

Die in der vorliegenden Studie analysierten Fettsäuremuster von *H. pylori* sind typisch für diese Species und korrelieren mit den Ergebnissen anderer Autoren. Tabelle 20 gibt eine Übersicht über das Vorkommen und die durchschnittliche Verteilung von Fettsäuren im Fettsäuremuster von *H. pylori*, wie sie in verschiedenen Studien gefunden wurden.

**Tabelle 20:** Vergleich der von verschiedenen Autoren beschriebenen gesamtzellulären Fettsäuremuster von *H. pylori* mit den in dieser Studie gefundenen.

Literatur- quelle	Nährmedium	Fettsäure in %									
		14:0	16:0	16:0 3OH	18:1 ω9c	18:1 Kompl.	18:1	18:0	18:2	19:0cyc	18:0 3OH
Geis et al. 1990	bluthaltig	40,75	3,50	6,00	-	-	*4,50	8,75	<2,2	21,75	6,75
Goodwin et al. 1985	bluthaltig	35,10	3,70	4,10	-	-	13,60	8,90	3,70	28,10	-
Goodwin et al. 1989	bluthaltig	38,75	5,75	5,50	-	-	14,75	7,75	2,75	16,75	2,50
Haque et al. 1996	bluthaltig	38,00	2,00	3,00	-	-	7,00	6,00	-	35,00	6,00
Itoh et al. 1987	bluthaltig	32,00	9,50	-	-	-	7,60	14,50	7,30	24,80	-
Lambert et al. 1987	bluthaltig	31,00	4,00	3,00	-	-	11,00	12,00	-	23,00	8,00
Scherer et al. 2003											
frischisolierte Stämme	IsoA	44,50	1,50	3,10	0	10,90	-	5,10	-	28,00	4,70
	CM55B	26,10	4,40	2,90	1,50	11,00	-	15,90	-	30,20	6,00
laboradaptierte Stämme	IsoA	47,70	1,40	2,20	0	6,30	-	5,00	-	29,70	3,90
	CM55B	45,00	2,40	2,10	0,90	6,40	-	7,30	-	29,20	4,00
vorliegende Studie											
frischisolierte Stämme	IsoA	44,11	1,51	2,78	0	7,48	-	4,94	-	31,06	4,67
	IsoB	38,98	2,91	3,10	1,52	7,37	-	7,27	-	29,81	5,05
	CM55A	39,84	1,29	2,80	0	7,41	-	5,37	-	32,54	5,21
	CM55B	39,14	3,37	2,77	2,04	4,00	-	9,82	-	30,62	4,44
laboradaptierte Stämme	IsoA	48,42	1,43	2,41	0	3,15	-	4,71	-	31,86	4,09
	IsoB	43,05	2,55	2,82	1,20	1,36	-	7,48	-	32,51	4,40
	CM55A	47,25	1,17	2,50	0	1,67	-	4,51	-	35,85	4,09
	CM55B	44,13	2,87	2,73	1,65	1,25	-	7,72	-	31,75	4,57

-: keine Angabe in der entsprechenden Untersuchung

\*: die im Chromatogramm gefundene Octadecensäure (18:1) wird von den Autoren als Ölsäure (18:1 ω9c) benannt

Alle Autoren beschreiben hohe Anteile an Myristinsäure (14:0) und Methylenoctadecensäure (19:0 cyc) im Fettsäuremuster von *H. pylori*, was eine bekannte Besonderheit von *H. pylori* und eng verwandten *Helicobacterspecies* (Haque et al. 1996) darstellt. Dafür fehlen bei *H. pylori* Hexadecensäuren (16:1) gänzlich und es werden gegenüber anderen Bakterienarten nur geringe Anteile an Hexadecensäuren (16:0) und Octadecensäuren (18:1) gefunden (Wilkinson 1988).

Insgesamt bestätigen die Analyseergebnisse der vorliegenden Studie die von Scherer et al. (2003) beschriebenen Fettsäuremuster für *H. pylori*. Es wurden lediglich geringfügig höhere Anteile an Ölsäure (18:1 ω9c) für beide *H. pylori*-Gruppen nach Kultur auf CM55-Blutagar gefunden. Da die Kulturen in der vorliegenden Studie zum Zeitpunkt der Fettsäureanalyse älter waren als die von Scherer et al. (2003), lässt sich dies mit dem beschriebenen Einfluss der Kulturdauer auf bluthaltigen Nährmedien auf das Fettsäuremuster von *H. pylori* erklären. Die von Scherer et al. (2003) im Fettsäuremuster von frischisolierten *H. pylori*-Stämmen nach Kultur auf CM55-5%-Schafblutagar

beschriebenen besonders niedrigen Anteile an Myristinsäure (14:0) konnten in der vorliegenden Studie durchschnittlich nicht reproduziert werden. Jedoch weist das Fettsäuremuster des von Scherer et al. (2003) ebenfalls untersuchten frischisolierten Stammes IMMi 589 nach Kultur auf CM55-10%-Blutagar entsprechend niedrige Anteile an Myristinsäure (14:0) auf sowie entsprechend hohe Stearinsäureanteile (18:0). Eine weitere Auffälligkeit in den durchschnittlichen Fettsäuremustern der beiden Stammgruppen dieser Studie im Vergleich zu den Ergebnissen von Scherer et al. (2003) sind jeweils niedrigere Anteile an Fettsäuren des Octadecensäurekomplexes (18:1 Komplex) und gleichzeitig höhere Anteile der Methylenoctadecansäure (19:0 cyc) (Tabelle 20).

Eine Erwähnung von Ölsäure (18:1  $\omega$ 9c) im Fettsäuremuster von *H. pylori* findet sich in Tabelle 20 neben der vorliegenden Studie nur bei Geis et al. (1990) und Scherer et al. (2003), wobei bei ersteren die Ölsäure (18:1  $\omega$ 9c) die alleinige Octadecensäure (18:1)-Fraktion ausmachte und Scherer et al. Ölsäure (18:1  $\omega$ 9c) zusätzlich neben einem Komplex aus weiteren, durch den verwendeten Gaschromatographen nicht weiter differenzierbaren Octadecensäuren (18:1) beschrieben. Tannæs et al. (2000) untersuchten das Fettsäuremuster von unterschiedlichen Kolonievarianten von *H. pylori* und beschrieben dabei ebenfalls Ölsäure (18:1  $\omega$ 9c) als separate Fraktion neben cis-Vacceninsäure (18:1  $\omega$ 7c). In allen Studien, in denen Ölsäure (18:1  $\omega$ 9c) im Fettsäuremuster von *H. pylori* beschrieben wurde, waren die entsprechenden Kulturen, wie in der vorliegenden Studie, zuvor auf bluthaltigen Nährmedien gezüchtet worden (Geis et al. 1990, Scherer et al. 2003, Tannæs et al. 2000).

Ölsäure (18:1  $\omega$ 9c) kommt natürlicherweise nicht im Fettsäuremuster von Bakterien vor, sondern wird allein in eukaryotischen Zellen gefunden. Bakterien sind in der Lage, Fettsäuren mit Hilfe von Acetyl-CoA-Carboxylase und Fettsäuresynthetase auf anaerobem Wege aus Acetat zu synthetisieren. Auf diesem Weg entstehen einfach ungesättigte Fettsäuren. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren kommen natürlicherweise nicht im Fettsäuremuster von Bakterien vor und wurden wiederholt als toxisch für Bakterien beschrieben (Hazell et al. 1990, Khulusi et al. 1995). Hauptsächlich finden sich in Bakterienzellen cis-Isomere von Fettsäuren, worunter die Vacceninsäure (18:1  $\omega$ 7c) dominiert. In bakteriellen Zellmembranen werden häufig auch zyklische Fettsäuren gefunden, diese kommen in eukaryotischen Zellen so gut wie nicht vor und stellen somit

eine bakterielle Besonderheit dar. Die zyklischen Fettsäuren entstehen in den Bakterienzellen durch Methylierung einfach ungesättigter Fettsäuren. Am häufigsten wird die cis-11,12-Methylenoctadecansäure (Lactobacillinsäure, 19:0 cyc) gefunden, deren Ausgangsprodukt die cis-Vacceninsäure (18:1  $\omega$ 7c) darstellt. Die Synthese erfolgt vorzugsweise in der späten exponentiellen und in der stationären Wachstumsphase und ist sehr energieaufwändig (Schweizer 1988).

Der in dieser Studie Octadecensäurekomplex (18:1 Komplex) genannte Komplex aus nicht weiter differenzierbaren Octadecensäuren (18:1) enthält laut MIS möglicherweise Vacceninsäure (18:1  $\omega$ 7c), Elaidinsäure (18:1  $\omega$ 9t) und trans-12-Octadecensäure (18:1  $\omega$ 12t) zu unbekannten Anteilen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Vacceninsäure (18:1  $\omega$ 7c) einen großen Teil des Octadecensäurekomplexes (18:1) ausmacht, da unter den einfach ungesättigten Fettsäuren in Bakterienzellen cis-Vacceninsäure (18:1  $\omega$ 7c) die dominierende ist und trans-Isomere insgesamt selten vorkommen. In den verwendeten Nährmedien waren neben Ölsäure (18:1  $\omega$ 9c) keine weiteren Octadecensäuren (18:1) enthalten, welche von *H. pylori* hätten aufgenommen werden können. Das wahrscheinliche Vorkommen von cis-Vacceninsäure (18:1  $\omega$ 7c) im Fettsäuremuster von *H. pylori* ist interessant, da diese Fettsäure das Ausgangsprodukt für die bakterielle Synthese von Methylenoctadecansäure (19:0 cyc) ist. Methylenoctadecansäure (19:0 cyc) wiederum ist eine der Hauptfettsäuren im gesamtzellulären Fettsäuremuster von *H. pylori* (Tabelle 20).

Die im Vergleich zu den Ergebnissen von Scherer et al. (2003), in dieser Studie niedrigeren Anteile an Fettsäuren des Octadecensäurekomplexes (18:1 Komplex) und gleichzeitig höheren Anteile der Methylenoctadecansäure (19:0 cyc) am durchschnittlichen Fettsäuremuster der beiden *H. pylori*-Stammgruppen (Tabelle 20) ist interessant im Hinblick auf die Synthese von Methylenoctadecansäure (19:0 cyc) aus Vacceninsäure (18:1  $\omega$ 7c), welche sehr wahrscheinlich einen großen Anteil des Octadecensäurekomplexes (18:1 Komplex) ausmacht (s.o.). Es ist also möglich, dass die Octadecensäurekomplexanteile in der vorliegenden Studie niedriger sind als in der Studie von Scherer et al. (2003), weil daraus bereits Methylenoctadecansäure (19:0 cyc) gebildet wurde. In der vorliegenden Studie waren die Kulturen zum Zeitpunkt der Fettsäureanalyse am sechsten Kulturtag einen Tag länger inkubiert worden als die Kulturen von Scherer et al. (2003).



Die frischisolierten *H. pylori*-Stämme wiesen durchschnittlich in ihrem Fettsäuremuster höhere Anteile an Fettsäuren des Octadecensäurekomplexes (18:1 Komplex) auf als die laboradaptierten Stämme. Gleichzeitig waren niedrigere Anteile der Methylenoctadecansäure (19:0 cyc) zu beobachten. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die frischisolierten Stämme in einer früheren Wachstumsphase geerntet wurden als die laboradaptierten Stämme, die Synthese von Methylenoctadecansäure (19:0 cyc) also noch nicht soweit fortgeschritten war. Die Kulturen waren jedoch gleich alt. Entweder wachsen die frischisolierten Stämme also langsamer oder die Kulturen waren bereits vor dem Zeitpunkt der Ernte in einer früheren Wachstumsphase abgerissen. Da der Unterschied zwischen den Anteilen der Methylenoctadecansäure (19:0 cyc) zwischen den beiden Stammgruppen aber gering ist und der Unterschied zwischen den Anteilen der Fettsäuren des Octadecensäurekomplexes (18:1 Komplex) deutlich ausgeprägt ist, ist dies vermutlich nicht die alleinige Ursache für die differierende Verteilung der oben genannten Fettsäuren in den Fettsäuremustern der beiden Stammgruppen.

Niedrig im Vergleich zu den übrigen Medien liegt der Anteil der Fettsäuren des Octadecensäurekomplexes (18:1 Komplex) am Fettsäuremuster der frischisolierten *H. pylori*-Stämme nach Kultur auf CM55-Blutmedien. Auffällig ist dabei, dass eben dieses Medium dasjenige ist, welches das geringste Wachstum der frischisolierten Stämme hervorgebracht hat. Gleichzeitig waren nach Kultur auf diesem Medium auch die durchschnittlichen Anteile der Ölsäure (18:1 ω9c) am gesamtzellulären Fettsäuremuster von *H. pylori* höher als nach Kultur auf den übrigen untersuchten Medien.

Fasst man die gefundenen Ergebnisse zusammen, so lässt sich sagen, dass in den vorliegenden Untersuchungen - im Bezug auf das Wachstum von *H. pylori* - zwei negative Bestandteile in den verwendeten Nährmedien benannt werden können. Dies ist einerseits das Grundsubstrat CM55 und andererseits sind es Fettsäuren im Schafblutsupplement, speziell die Ölsäure (18:1 ω9c). Daraus lässt sich eine Rangfolge der potentiellen Schädlichkeit der Nährmedien für die Kultur von *H. pylori* ableiten. Demnach wäre CM55-Schafblutagar mit zwei negativen Bestandteilen am wenigsten für die Kultur von *H. pylori* geeignet. An zweiter Stelle folgen CM55-Albuminagar und Isosenistest-Schafblutagar mit jeweils einem negativen Bestandteil und am geeignetsten für die Kultur von *H. pylori* wäre Isosensitest-Albuminagar, der keinen der als negativ beurteilten Faktoren enthält. Vergleicht man diese aufgestellte Rangfolge mit den durchschnittlichen Fettsäuremustern

von *H. pylori* (Tabelle 16), so fällt auf, dass die prozentualen Anteile der Fettsäuren des Octadecensäurekomplexes (18:1 Komplex) diese Rangfolge widerspiegeln. Dabei erbringt CM55-Schafblutagar die niedrigsten Anteile, in der Mitte liegen die Anteile bei CM55-Albuminagar und Isosenitest-Schafblutagar und am höchsten sind die Anteile an Fettsäuren des Octadecensäurekomplexes (18:1 Komplex) am Fettsäuremuster von *H. pylori* nach Kultur auf Isosensitest-Albuminagar. Diese Aussage trifft für beide Stammgruppen, also laboradaptierte und frischisolierte *H. pylori*-Stämme, gleichermaßen zu. Möglicherweise ist also der Octadecensäurekomplex (18:1 Komplex) ein Indikator für gesunde, gut wachsende *H. pylori*-Stämme. Um die 18:1-Fettsäuren als solchen Indikator zu verwenden, ist es zwingend notwendig, die toxische Ölsäure im Fettsäuremuster von *H. pylori* separat zu bestimmen und deren Anteile nicht in die Anteile der Fettsäuren des Octadecensäurekomplexes (18:1 Komplex) mit einfließen zu lassen.

## 6 Zusammenfassung

Um Hinweise auf die Bedingungen des Wachstums, der Variabilität des Fettsäuremusters und der Rundformbildung von *H. pylori* zu erhalten, wurden die Agar-Grundsubstrate CM55 und Isosensitest mit den Supplementen Schafblut (1-10%) und fettfreies Rinderalbumin (0,05-1,0%) systematisch geprüft. Als Testorganismen dienten sowohl laboradaptierte (ATCC) als auch frischisolierte (IMMi) *H. pylori*-Stämme.

1. Die Supplementierung der Grundsubstrate mit 5% Blut und 0,5% Albumin ist ausreichend, um nach sechs Tagen Inkubation Wachstum zu erhalten. Die Erntemenge ist mit ca. 100 mg Feuchtgewicht pro Kulturplatte bei Isosensitest-Medien deutlich höher als bei CM55-Medien mit ca. 30 mg Feuchtgewicht pro Kulturplatte. Isosensitest-Agar ist somit als Grundsubstrat dem CM55-Agar überlegen.

2. Das Fettsäuremuster ist in qualitativer und quantitativer Hinsicht vom untersuchten Stamm, vom verwendeten Grundsubstrat, vom eingesetzten Supplement und von der Dauer der Kultur abhängig. Die albumin-supplementierten Nährmedien sind fettsäurefrei, die blut-supplementierten Nährmedien enthalten hauptsächlich Ölsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure. Der Vergleich der Fettsäuremuster nach Kultur auf den unterschiedlichen Nährmedien zeigt, dass Ölsäure, Palmitin- und Stearinsäure zusätzlich aus blut-supplementierten Nährmedien aufgenommen werden. Die Fettsäureaufnahme ist bei frischisolierten Stämmen höher als bei laboradaptierten Stämmen. Das Grundsubstrat CM55 fördert die Fettsäureaufnahme stärker als das Grundsubstrat Isosensitest. Unterschiedliche Angaben in der Literatur über das Fettsäuremuster von *H. pylori* lassen sich somit unschwer durch unterschiedliche Kulturbedingungen erklären.

3. Die Bildung von Rundformen im Verlauf der Kultur auf Isosensitest-Agar mit Albumin ist stärker ausgeprägt als auf Isosensitest-Agar mit Blut. Damit ist belegt, dass kein entscheidender Zusammenhang zwischen Rundformbildung und der Aufnahme eventuell toxischer Fettsäuren, z.B. Ölsäure, aus dem Nährmedium besteht.

## 7 Literaturverzeichnis

1. **Albertson, N., Wenngren, I., Sjöström, J.-E. (1998):**  
Growth and survival of *Helicobacter pylori* in defined medium and susceptibility to brij 78.  
J Clin Microbiol 36(5), 1232-1235
2. **Andersen, A.P., Elliott, D.A., Lawson, M., Barland, P., Hatcher, V.B., Puszkin, E.G. (1997):**  
Growth and morphological transformations of *Helicobacter pylori* in broth media.  
J Clin Microbiol 35(11), 2918-2922
3. **Ansorg, R., Müller, K.D., von Recklinghausen, G., Nalik, H.P. (1992):**  
Cholesterol binding of *Helicobacter pylori*.  
Zbl Bakt 276, 323-329
4. **Ansorg, R., von Recklinghausen, G., Pomarius, R., Schmid, E.N. (1991):**  
Evaluation of techniques for isolation, subcultivation, and preservation of *Helicobacter pylori*.  
J Clin Microbiol 29(1), 51-53
5. **Benaissa, M., Babin, P., Quillard, N., Pezennec, L., Cenatiempo, Y., Fauchere, J. L. (1996):**  
Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form.  
Infect Immun 64(6), 2331-2335
6. **Bizzozero, G. (1892):**  
Sule ghiandole tubulari del tube gastroenterico e sui rapporti del loro coll'epitelio de rivestimento dela mucosa.  
Atti R Accad Sci Torino 28, 233-251
7. **Bode, G., Mauch, F., Malfertheiner, P. (1993):**  
The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability.  
Epidemiol Infect 111, 483-490
8. **Catrenich, C.E., Makin, K.M. (1991):**  
Characterization of the morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid forms.  
Scand J Gastroenterol 26(181), 58-64

9. **Cattoli, G., van Vugt, R., Zanoni, R.G., Sanguinetti, V., Chinocchetti, R., Gualtieri, M., Vandenbrouke-Grauls, C.M.J.E., Gaastra, W., Kusters, J.G., (1999):**  
Occurrence and characterization of gastric *Helicobacter* spp. in naturally infected dogs.  
Vet Microbiol 70, 239-250
10. **Cellini, L., Allocati, N., Angelucci, D., Iezzi, T., Di Campli, E., Marzio, L., Dainelli, B. (1994):**  
Coccoid *Helicobacter pylori* not culturable in vitro reverts in mice.  
Microbiol Immunol, 38(11), 843-850
11. **Chan, W.-Y., Hui P.-K., Leung K.-M., Chow J., Kwok, F., Ng, C.-S. (1994):**  
Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach.  
Clin Microbiol Infect Dis 102(4), 503-507
12. **Cole, S.P., Kharitonov, V.F., Guiney, D.G., (1999):**  
Effect of nitric oxide on *Helicobacter pylori* morphology.  
J Infect Dis 180, 1713-1717
13. **Coudron, P.E., Kirby, D.F. (1989):**  
Comparison of rapid urease tests, staining techniques, and growth on different solid media for detection of *Campylobacter pylori*.  
J Clin Microbiol 27(7), 1527-1530
14. **Degnan, A.J., Sonozogni, W.C., Standridge, J.H. (2003):**  
Development of a plating medium for selection of *Helicobacter pylori* from water samples.  
Appl Environ Microbiol 69(5), 2914-2918
15. **Dieterich, C., Wiesel, P., Neiger, R., Blum, A., Cortesy-Theulaz, I. (1998):**  
Presence of multiple "*Helicobacter heilmannii*" strains in an individual suffering from ulcers and in his two cats.  
J Clin Microbiol 36(5), 1366-1370
16. **Eaton, K.A., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Tzellas, N., Coleman, B.E., Paola, J., Sherding, R. (1996):**  
Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs. Animal and public health implications.  
J Clin Microbiol 34(12), 3165-3170

17. **Eaton, K.A., Dewhirst, F.E., Radin, M.J., Fox, J.G., Paster, B.J., Krakowka, S., Morgan, D.R. (1993):**  
*Helicobacter acinonyx* sp. nov., isolated from cheetahs with gastritis.  
Int J Syst Bacteriol 43(1), 99-106
18. **Eaton, K.A., Radin, M.J., Kramer, L., Wack, R., Sherding, R., Krakowka, S., Morgan, D.R. (1991):**  
Gastric spiral bacilli in captive cheetahs.  
Scand J Gastroenterol 26(181), 38-42
19. **El-Zaatari, F.A., Woo, J.S., Badr, A., Osato, M.S., Serna, H., Lichtenberger, L.M., Genta, R.M., Graham, D.Y. (1997):**  
Failure to isolate *Helicobacter pylori* from stray cats indicates that *H. pylori* in cats may be an anthroponosis- an animal infection with a human pathogen.  
J Med Microbiol 46, 372-376
20. **Foley, J.E., Marks, S.L., Munson, L., Melli, A., Dewhirst, F.E., Yu, S., Shen, Z., Fox, J.G. (1999):**  
Isolation of *Helicobacter canis* from a colony of bengal cats with endemic diarrhea.  
J Clin Microbiol 37(10), 3271-3275
21. **Fox, J. G. (2002):**  
The non-*H. pylori* helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases.  
Gut 50, 273-283
22. **Fox, J.G., Cabot, E.B., Taylor, N.S., Laraway, R. (1988):**  
Gastric colonization by *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* in ferrets.  
Infect Immun 56(11), 2994-2996
23. **Fox, J.G., Dewhirst, F.E., Tully, J.G., Paster, B.J., Yan, L., Taylor, N.S., Collins, Jr., Gorelick, P.L., Ward, J.M. (1994):**  
*Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice.  
J Clin Microbiol 32(5), 1238-1245
24. **Fox, J.G., Drolet, R., Higgins, R., Messier, S., Yan, L., Coleman, B.E., Paster, B.J., Dewhirst, F.E. (1996):**  
*Helicobacter canis* isolated from a dog liver with multifocal necrotizing hepatitis.  
J Clin Microbiol 34(10), 2479-2482

- 
25. **Fox, J.G., Shen, Z., Shilu, X., Feng, Y., Dangler, C.A., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Cullen, J.M. (2002):**  
*Helicobacter marmotae* sp. nov. isolated from livers of woodchucks and intestines of cats.  
J Clin Microbiol 40(7), 2513-2519
26. **Fox, J.G., Yan, L.L., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Shames, B., Murphy, J.C., Hayward, A., Belcher, J.C., Mendes, E.N. (1995):**  
*Helicobacter bilis* sp.nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice.  
J Clin Microbiol 33(2), 445-454
27. **Franklin, C.L., Gorelick, P.L., Riley, L.K., Dewhirst, F.E., Livingston, R.S., Ward, J.M., Beckwith, C.S., Fox, J.G. (2001):**  
*Helicobacter thyphlonius* sp. nov., a novel murine urease-negative *Helicobacter* species.  
J Clin Microbiol 39(11), 3920-3926
28. **Geis, G., Leying, H., Suerbaum, S., Opferkuch, W. (1990):**  
Unusual fatty acid substitution in lipids and lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori*.  
J Clin Microbiol 28(5): 930-932
29. **Goodwin, C.S., Armstrong, J.A. (1990):**  
Microbial aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*).  
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 9(1), 1-13
30. **Goodwin, C.S., Blincow, E.D., Warren, J.R. Waters, T.E., Sanderson, C.R., Easton, L. (1985):**  
Evaluation of cultural techniques for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa.  
J Clin Pathol 38, 1127-1131
31. **Goodwin, C.S., McConnell, W., McCulloch, R.K., McCullough, C., Hill, R., Bronsdon, M.A., Kasper, G. (1989):**  
Cellular fatty acid composition of *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other *Campylobacters*.  
J Clin Microbiol 27(5), 938-943
32. **Goodwin, C.S., McCulloch, R.K., Armstrong, J.A. and Wee, S.H. (1985):**  
Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa.  
J Med Microbiol 19, 257-267

33. **Handt, L.K., Fox, J.G., Stalis, I.H., Rufo, R., Lee, G., Linn, J., Li, X., Kleanthous, H. (1995):**  
Characterization of feline *Helicobacter pylori* strains and associated gastritis in a colony of domestic cats.  
J Clin Microbiol 33(9), 2280-2289
34. **Handt, L.K., Fox, J.G., Yan, L.L., Shen, Z., Pouch, W.J., Ngai, D., Motzel, S.L., Nolan, T.E., Klein, H.J. (1997):**  
Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in a colony of rhesus monkeys (*macaca mulatta*).  
J Clin Microbiol 35(1), 165-168
35. **Hänninen, M.L., Utriainen, M., Happonen, I., Dewhirst, F.E. (2003):**  
*Helicobacter* sp. flexispira 16s rDNA taxa 1,4 and 5 and Finnish porcine *Helicobacter* isolates are members of the species *Helicobacter trogontum* (taxon 6).  
Int J Syst Evol Microbiol 53, 425-433
36. **Happonen, I., Saari, S., Castren, L., Tyni, O., Hänninen, M.-L., Westermarck, E. (1996):**  
Occurrence and topographical mapping of gastric *Helicobacter*-like organisms and their association with histological changes in apparently healthy dogs and cats.  
J Vet Med A43, 305-315
37. **Haque, M., Hirai, Y., Yokota, K., Mori, N., Jahan, I., Ito, H., Hotta, H., Yano, I., Kanemasa, Y., Oguma, K. (1996):**  
Lipid profile of *Helicobacter* spp.: Presence of cholesteryl glucoside as a characteristic feature.  
J Bacteriol 178(7), 2065-2070
38. **Harper, C.M.G., Dangler, C.A., Xu, S., Feng, Y., Shen, Z., Sheppard, B., Stamper, A., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Fox, J.G. (2000):**  
Isolation and characterization of a *Helicobacter* sp. from the gastric mucosa of dolphins, *lagenorhynchus acutus* and *delphinus delphis*.  
Appl Environ Microbiol 66(11), 4751-4757
39. **Harper, C.M.G., Feng, Y., Xu, S., Taylor, N.S., Kinsel, M., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Greenwell, M., Levine, G., Rogers, A., Fox, J.G. (2002):**  
*Helicobacter cetorum* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species isolated from dolphins and whales.  
J Clin Microbiol 40(12), 4536-4543



- 
40. **Harper, C.M.G., Whary, M.T., Feng, Y., Rhinehart, H.L., Wells, R.S., Xu, S., Taylor, N.S., Fox, J.G. (2003):**  
Comparison of diagnostic techniques for *Helicobacter cetorum* infection in wild atlantic bottlenose dolphins.  
J Clin Microbiol 41(7), 2842-2848
41. **Hartzen, S.H., Andersen, L.P., Bremmelgaard, A., Colding, H., Arpi, M., Kristiansen, J., Justesen, T., Espersen, F., Frimodt-Møller, N., Bonnevie, O. (1997):**  
Antimicrobial susceptibility testing of 230 *Helicobacter pylori* strains: Importance of medium, inoculum, and incubation time.  
Antimicrob Agents Chemother 41(12), 2634-2639
42. **Hazell, S. L., Graham, D. Y. (1990):**  
Unsaturated fatty acids and viability of *Helicobacter (Campylobacter) pylori*.  
J Clin Microbiol 28(5), 1060-1061
43. **Itoh, T., Yahagawa, Y., Shingaki, M., Takahashi, M., Kai, A., Ohashi, M., Hamana, G. (1987):**  
Isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa and characterization of the isolates.  
Microbiol Immunol 31, 603-614
44. **Jones, D.M., Curry, A. (1990):**  
The genesis of coccal forms of *Helicobacter pylori*.  
In: Malfertheiner, P., Ditschuneit, H. (Hrsg.): *Helicobacter pylori*, gastritis and peptic ulcer; S. 29-37.  
Berlin: Springer-Verlag
45. **Khulusi, S., Ahmed, H.A., Patel, P., Mendall, M.A., Northfield, T.C. (1995):**  
The effects of unsaturated fatty acids on *Helicobacter pylori* in vitro.  
J Med Microbiol 42, 276-282
46. **Kiehlbauch, J.A., Brenner, D.J., Cameron, D.N., Steigerwalt, A.G., Makowski, J.M., Baker, C.N., Patton, C.M., Wachsmuth, I.K (1995):**  
Genotypic and phenotypic characterization of *Helicobacter cinaedi* and *Helicobacter fenalliae* strains isolated from humans and animals.  
J Clin Microbiol. 33(11), 2940-2947
47. **Knapp, H. R., Melly, M. A (1986):**  
Bactericidal effects of polyunsaturated fatty acids.  
J Infect Dis 154(1), 84-94

- 
48. **Kusters, J.G., Gerrits, M.M., Van Strijp, J.A.G., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E. (1997):**  
Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death.  
Infect Immun 65(9), 3672-3679
49. **Labenz, J., Meining, A., Tillenburger, B., Stolte, M. (1999):**  
Helicobacteriose: Update 1999.  
Leber Magen Darm 29: 80-92
50. **Lambert, M.A., Patton, C.M., Barrett, T.J., Moss, C.W. (1987):**  
Differentiation of *Campylobacter* and *Campylobacter*-like organisms by cellular fatty acid composition.  
J Clin Microbiol 25(4), 706-713
51. **Lechevalier, H., Lechevalier, M.P. (1988):**  
Chemotaxonomic Use of Lipids – an Overview.  
In: Ratledge, C., Wilkinson, S.G. (Hrsg.): Microbial Lipids.  
Bd 1; S. 869-903. London: Academic Press
52. **Lee, A., Hazell, S.L., O'Rourke, J., Kouprach, S. (1988):**  
Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach.  
Infect Immun 56(11), 2843-2850
53. **Lee, A., Phillips, M.W., O'Rourke, L.J., Paster, B.J., Dewhirst, F.E., Fraser, G.J., Fox, J.G., Sly, L.I., Romaniuk, P.J., Trust, T.J., Kouprach, S. (1992):**  
*Helicobacter muridarum* sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolates from the intestinal mucosa of rodents.  
Int J Syst Bacteriol 42(1), 27-36
54. **Marshall, B.J., Royce, H., Annear, D.I., Goodwin, C.S., Pearman, J.W., Warren, J.R., Armstrong, J.A. (1984):**  
Original isolation of *campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa.  
Microbios Letters 25, 83-88
55. **Marshall, B.J., Warren, J.R. (1984):**  
Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration.  
Lancet I/1984, 1311-1314

56. **Norris, C.R., Marks, S.L., Eaton, K.A., Torabian, S.Z., Munn, R.J., Solnick, J.V. (1999):**  
Healthy cats are commonly colonized with “*Helicobacter heilmannii*” that is associated with minimal gastritis.  
J Clin Microbiol 37(1), 189-194
57. **Olivieri, R., Bugnoli, M., Armellini, D. Bianciardi, S., Rappuoli, R., Bayeli, P.F., Abate, L., Esposito, E., De Gregorio, L., Aziz, J., Basagni, C., Figura, N. (1993):**  
Growth of *Helicobacter pylori* in media containing cyclodextrins.  
J Clin Microbiol 31(1), 160-162
58. **On, S.L.W. (1996):**  
Identification methods for Campylobacters, Helicobacters, and related organisms.  
Clin Microbiol Rev 9(3), 405-422
59. **Oxley, A.P.A., Powell, M., McKay, D.B. (2004):**  
Species of the family *Helicobacteraceae* detected in an australian sea lion (*neophoca cinerea*) with chronic gastritis.  
J Clin Microbiol 42(8), 3505-3512
60. **Patterson, M.M., O’Toole, P.W., Forester, N.T., Noonan, B., Trust, T.J., Xu, S., Taylor, N.S., Marini, R.P., Ihrig, M.M., Fox, J.G. (2003):**  
Failure of surface ring mutant strains of *Helicobacter mustelae* to persistently infect the ferret stomach.  
Infect Immun 71(5), 2350-2355
61. **Patterson, M.M., Schrenzel, M.D., Feng, Y., Xu, S., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Thibodeau, S.A., Versalovic, J., Fox, J.G. (2000):**  
*Helicobacter aurati* sp. nov., a urease-positiv *Helicobacter* species cultured from gastrointestinal tissues of syrian hamsters.  
J Clin Microbiol 38(10), 3722-3728
62. **Queiroz, D.M.M., Mendes, E.N., Rocha, G.A. (1987):**  
Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*.  
J Clin Microbiol 25(12), 2378-2379
63. **Queiroz, D.M.M., Rocha, G.A., Mendes, E.N., Moura, S.B., Oliveira, A.M.R., Miranda, D. (1996):**  
Association between *Helicobacter* and gastric ulcer disease of the pars esophagea in swine.  
Gastroenterol 111, 19-27

**64. Rappin, J.P. (1881):**

Contribution a l'étude bactéries de la boeche a l'état normal.

In: Breed, R.S., Murray, E.G.D., Hitchens, A.P. (Hrsg.): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, sixth Edition, 1948, S. 217.

Baltimore: The Williams and Wilkons Company

**65. Ratledge C., Wilkinson S.G. (1988):** Fatty acids, related and derived lipids. In:  
Ratledge, C., Wilkinson, S. G. (Hrsg.): Microbial Lipids. Bd 1; S. 23-52. London:  
Academic Press**66. Reynolds, D.J., Penn, C.W. (1994):**

Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements.

Microbiol 140, 2649-2656

**67. Sachs, L. (1974):**

Angewandte Statistik. Vierte Auflage.

Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag

**68. Saito, N., Konishi, K., Sato, F., Kato, M., Takeda, H., Sugiyama, T., Asaka, M. (2003):**

Plural transformation-processes from spiral to coccoid *Helicobacter pylori* and its viability.

J Infect 46, 49-55

**69. Salomon H. (1896):**

Über das Spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen.

Zentralblatt Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. 19, 433-441

**70. Sasser, Myron (1990):**

Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids.

MIDI Technical Note Nr: 101

**71. Sato, F., Saito, N., Konishi, K. Shoji, E., Kato, M., Takeda, H., Sugiyama, T., Asaka, M. (2003):**

Ultrastructural observation of *Helicobacter pylori* in glucose-supplemented culture media.

J Med Microbiol 52, 675-679

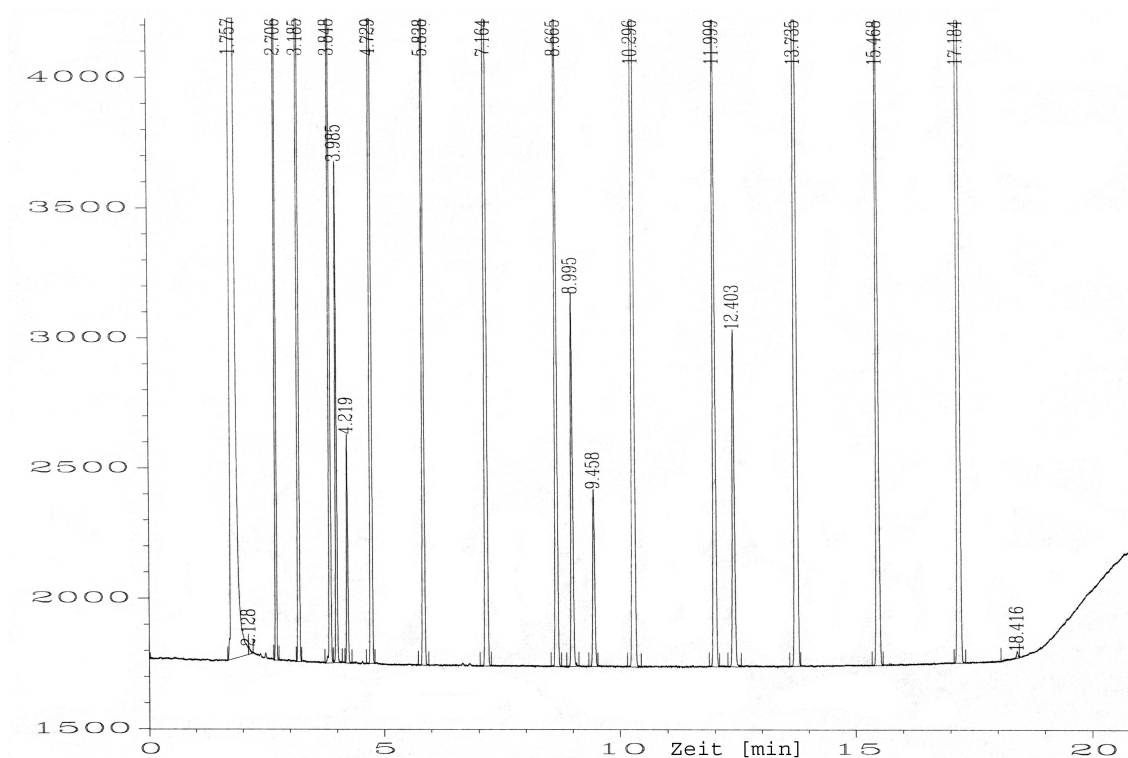
72. **Scherer C., Müller K.D., Rath P.M., Ansorg R.A.M., 2003:** Influence of Culture Conditions on the Fatty Acid Profiles of Laboratory- Adapted and Freshly Isolated Strains of *Helicobacter pylori*.  
J Clin Microbiol 41(3):1114-1117
73. **Schweizer, E. (1988):**  
Biosynthesis of fatty acids and related compounds.  
In: Ratledge, C., Wilkinson, S.G. (Hrsg.): Microbial Lipids. Bd 2; S. 3-50.  
London: Academic Press
74. **Shen, Z., Fox, J.G., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Foltz, C.J., Yan, L., Shames, B., Perry, L. (1997):**  
*Helicobacter rodentium* sp. nov., a urease-negative *helicobacter* species isolated from laboratory mice.  
Int J Syst Bacteriol 47(3), 627-634
75. **Simmons, J.H., Riley, L.K., Besch-Williford, C.L., Franklin, C.L. (2000):**  
*Helicobacter mesocricetorum* sp. nov., a novel *Helicobacter* isolated from the feces of syrian hamsters.  
J Clin Microbiol 38(5), 1811-1817
76. **Solnick, J.V., Schauer, D.B. (2001):**  
Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases.  
Clin Microbiol Rev 14(1), 59-97
77. **Sörberg, M., Nilsson, M., Hanberger, H., Nilsson, L.E. (1996):**  
Morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid form.  
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 15, 216-219
78. **Stanley, J., Linton, D., Burnens, A.P., Dewhirst, F.E., On, S.L., Porter, A., Owen, R.J., Costas, M. (1994):**  
*Helicobacter pullorum* sp. nov.- genotype and phenotype of a new species isolates from poultry and from human patients with gastroenteritis.  
Microbiol 140, 3441-3449
79. **Stark, R.M., Greenman, J., Millar, M.R. (1995):**  
Physiology and biochemistry of *Helicobacter pylori*.  
British Journal of Biomedical Science. 52, 282-290

80. **Steinbrueckner, B., Haerter, G., Pelz, K., Burnens, A., Kist, M. (1998):**  
Discrimination of *Helicobacter pullorum* and *Campylobacter lari* by analysis of whole cell fatty acid extracts.  
FEMS Microbiology Letters 168, 209-212
  
81. **Strauss-Ayali, D., Scanziani, E., Deng, D., Simpson, K.W. (2001):**  
*Helicobacter* spp. infection in cats; evaluation of the humoral immune response and prevalence of gastric *Helicobacter* spp..  
Vet Microbiol 79, 253-265
  
82. **Suerbaum, S., Kraft, C., Dewhirst, F.E., Fox, J.G. (2002):**  
*Helicobacter nemestrinae* ATCC 49396(T) is a strain of *Helicobacter pylori* (Marshall et al. 1985) Goodwin et al. 1989, and *Helicobacter nemestrinae* Bronsdon et al. is therefore a junior heterotypic synonym of *Helicobacter pylori*.  
Int J Syst Evol Microbiol 52, 437-439
  
83. **Tannæs, T., Grav, H.J., Bukholm, G. (2000):**  
Lipid profiles of *Helicobacter* colony variants.  
APMIS 108, 349-356
  
84. **Testerman, T.L., McGee, D.J., Mobley, H.L.T. (2001):**  
*Helicobacter pylori* growth and urease detection in the chemically defined medium Ham's F-12 Nutrient Mixture.  
J Clin Microbiol 39(11), 3842-3850
  
85. **Thompson, L., Cockayne, A., Spiller, R.C. (1994):**  
Inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on the growth of *Helicobacter pylori*: a possible explanation of the effect of diet on peptic ulceration.  
Gut 35, 1557-1561
  
86. **Van den Bulck, K., Baele, M., Hermans, K., Ducatelle, r., Haesebrouck, F., Decostere, A. (2005):**  
First report on the occurrence of "*Helicobacter heilmannii*" in the stomach of rabbits.  
Veterinary Research Communications 29, 271-279
  
87. **Versalovic, J., Fox, J.G. (2003):**  
*Helicobacter*.  
In: Murray P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.A., Tenover, R.H. Hrsg.):  
Manual of Clinical Microbiology. 8<sup>th</sup> Edition. S.915-928.  
Washington D.C., ASM Press

- 
88. **Waldenström, J., On, S.L.W., Ottwall, R., Hasselquist, D., Harrington, C.S., Olsen, B. (2003):**  
Avian reservoirs and zoonotic potential of the emerging human pathogen *Helicobacter canadensis*.  
Appl Environ Microbiol 69(12), 7523-7526
89. **Walsh, E.J., Moran, A.P. (1997):**  
Influence of medium composition on the growth and antigen expression of *Helicobacter pylori*.  
J Appl Microbiol 83, 67-75
90. **Westblom, T.U., Madan, E., Midkiff, B.R. (1991):**  
Egg yolk emulsion agar, a new medium for the cultivation of *Helicobacter pylori*.  
J Clin Microbiol 29(4), 819-821
91. **Wilkinson, S.G. (1988):**  
Gram-negative bacteria.  
In: Ratledge, C., Wilkinson, S.G. (Hrsg.): Microbial Lipids. Bd 1; S. 299-489.  
London: Academic Press
92. **Yamaguchi, H., Osaki, T., Takahashi, M., Taguchi, H., Kamiya, S. (1999):**  
Colony formation by *Helicobacter pylori* after long-term incubation under anaerobic conditions.  
FEMS Microbiol Lett 175, 107-111

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungen



Retentionszeit	Fettsäure	Retentionszeit	Fettsäure
1,757	Lösungsmittel	8,995	14:0 2OH
2,706	9:0	9,458	14:0 3OH/
3,185	10:0		16:1 Iso I
3,848	11:0	10,296	16:0
3,985	10:0 2OH	11,999	17:0
4,729	12:0	12,403	16:0 2OH
5,838	13:0	13,735	18:0
7,164	14:0	15,468	19:0
8,665	15:0	17,184	20:0

Abb. 6: Chromatogramm der MIDI Kalibrationsmischung



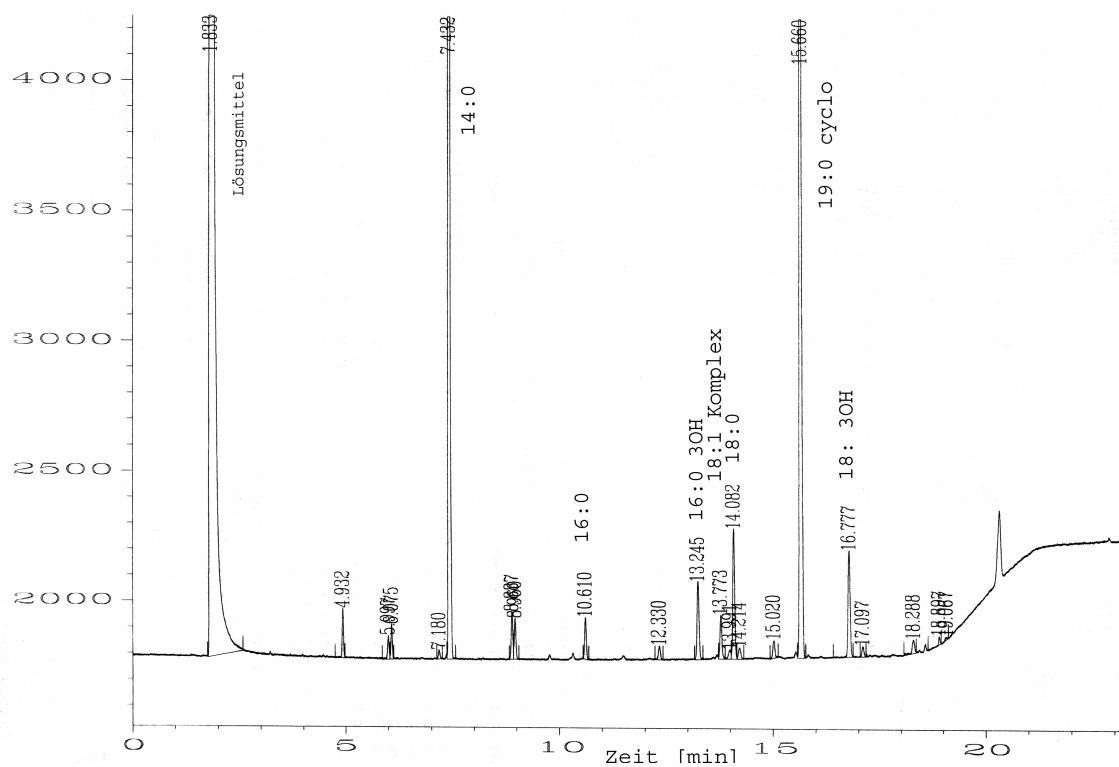


Abb. 7: Chromatogramm von *H. pylori* ATCC 700392 nach dreitägiger Kultur auf Isosensitest-0,5%-Albuminagar (die Kultur enthielt etwa 20% Rundformen).

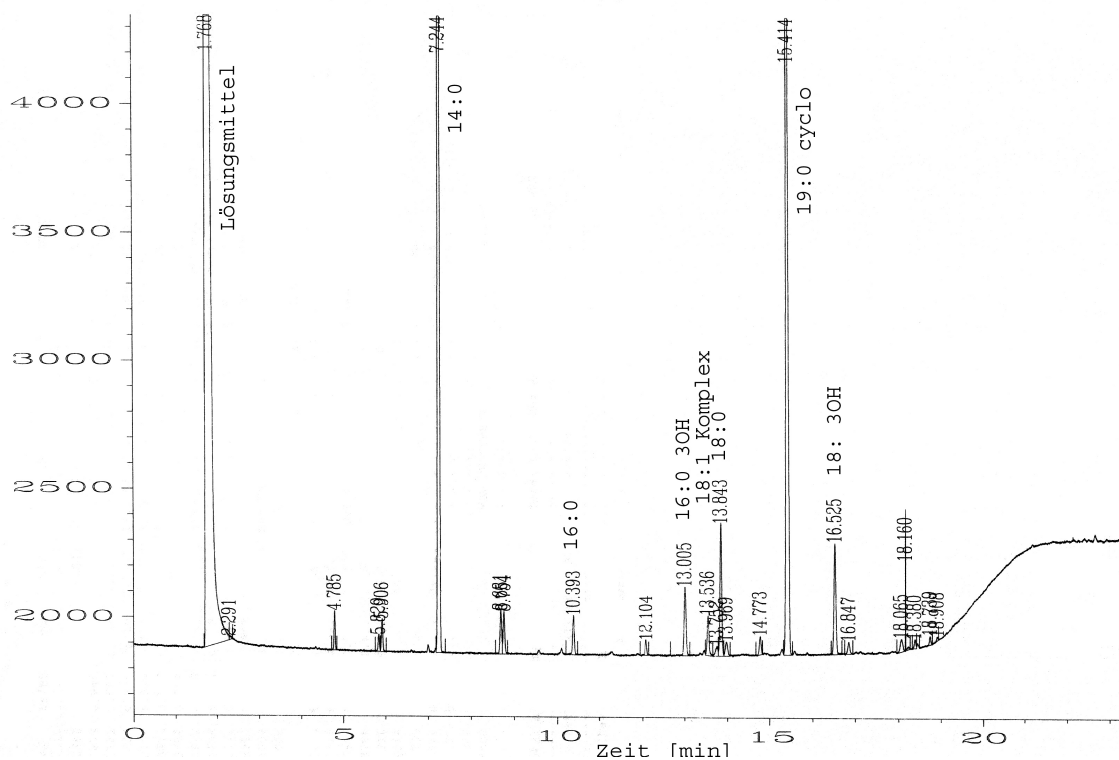


Abb. 8: Chromatogramm von *H. pylori* ATCC 700392 nach elftägiger Kultur auf Isosensitest-0,5%-Albuminagar (die Kultur enthielt etwa 70% Rundformen).

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

- A Albumin
- Aqua dest. Aqua destillata
- ATCC American Type Culture Collection
- B Blut
- CM55 Fleischextrakt- Peptonagar
- ECL äquivalente Kettenlänge
- FG Feuchtgewicht
- *H.* *Helicobacter*
- IMMi Institut für Medizinische Mikrobiologie
- Iso Isosensitest
- lat. lateinisch
- MALT Mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe
- MIS Sherlock Mikroben Identifikations System
- V Variationskoeffizient

### 8.3 Tabellenverzeichnis

- **Tabelle 1:** Übersicht über Species des Genus *Helicobacter* ..... 4
- **Tabelle 2:** Fettsäuremuster unbeimpfter Nährmedien der Grunds substrate CM55 und Isosensitest, jeweils pur sowie supplementiert mit 1% Albumin bzw. 10% Schafblut ..... 35
- **Tabelle 3:** Anzahl der nach sechs Tagen auf mit unterschiedlichen Konzentrationen an Schafblut supplementierten CM55- und Isosensitest-Medien gewachsenen *H. pylori*-Stämme ..... 36
- **Tabelle 4:** Anzahl der spätestens am sechsten Kulturtag auf albuminsupplementierten Medien verschiedener Konzentrationen gewachsenen *H. pylori*-Stämme ..... 37
- **Tabelle 5:** Durchschnittlicher Wachstumsbeginn von *H. pylori* auf albuminhaltigen und bluthaltigen Nährmedien ..... 37
- **Tabelle 6:** Erntemengen von *H. pylori* pro Kulturplatte in mg Feuchtwicht (FG) am sechsten Tag nach Kultur auf CM55-Medien mit ansteigender Schafblutkonzentration ..... 38
- **Tabelle 7:** Erntemengen von *H. pylori* pro Kulturplatte in mg Feuchtwicht (FG) am sechsten Tag nach Kultur auf Isosensitest-Medien mit ansteigender Schafblutkonzentration ..... 39
- **Tabelle 8:** Erntemengen von *H. pylori* pro Kulturplatte in mg Feuchtwicht (FG) am sechsten Tag nach Kultur auf CM55-Medien mit ansteigender Albuminkonzentration ..... 40
- **Tabelle 9:** Erntemengen in mg Feuchtwicht (FG) von *H. pylori* am sechsten Tag nach Kultur auf Isosensitest-Medien mit ansteigender Albuminkonzentration ..... 41
- **Tabelle 10:** Durchschnittliche Erntemengen pro Kulturplatte der ATCC-Stämme gegenüber denen der IMMi-Stämme nach Kultur auf Blutmedien aus zwei verschiedenen Grunds substraten ..... 43
- **Tabelle 11:** Durchschnittliche Erntemengen pro Kulturplatte der ATCC-Stämme gegenüber denen der IMMi-Stämme nach Kultur auf Albuminmedien aus zwei verschiedenen Grunds substraten ..... 44
- **Tabelle 12:** Durchschnittliches Fettsäuremuster verschiedener *H. pylori*-Stämme nach Kultur auf Isosensitest- und CM55-Medien mit ansteigender Blutkonzentration ..... 46
- **Tabelle 13:** Durchschnittliches Fettsäuremuster der *H. pylori*-Stammgruppen IMMi und ATCC nach Kultur auf Isosensitest- und CM55-Medien mit ansteigender Blutkonzentration ..... 48

- **Tabelle 14:** Durchschnittliches Fettsäuremuster verschiedener *H. pylori*-Stämme nach Kultur auf CM55- und Isosensitest-Medien mit ansteigender Albuminkonzentration ..... **49**
- **Tabelle 15:** Durchschnittliches Fettsäuremuster der *H. pylori*-Gruppen ATCC und IMMi nach Kultur auf Isosensitest- und CM55-Medien mit ansteigender Albuminkonzentration ..... **50**
- **Tabelle 16:** Durchschnittliche Fettsäureverteilung mit Variationskoeffizient V von *H. pylori* gesamt sowie der beiden Stammgruppen frischisolierte (IMMi) und laboradaptierte (ATCC) Stämme einzeln am sechsten Kulturtag, auf vier verschiedenen Medien, unabhängig von der Konzentration des Zusatzes ..... **52**
- **Tabelle 17:** Verteilung der Wuchsformen von *H. pylori* an unterschiedlichen Inkubationstagen nach Kultur auf albuminhaltigen und bluthaltigen Isosensitest-Medien ..... **55**
- **Tabelle 18:** Fettsäuremuster der vier *H. pylori*-Stämme nach Kultur auf Isosensitest-0,5%-Albuminagar im Kulturverlauf..... **59**
- **Tabelle 19:** Fettsäuremuster der vier *H. pylori*-Stämme nach Kultur auf Isosensitest-5%-Blutagar im Kulturverlauf ..... **60**
- **Tabelle 20:** Vergleich der von verschiedenen Autoren beschriebenen gesamtzellulären Fettsäuremuster von *H. pylori* mit den in dieser Studie gefundenen..... **68**

## Lebenslauf

ANDREA HAAR

PERSÖNLICHE ANGABEN: geboren am 13.09.1977 in Moers  
verheiratet

Eltern: Dr. Friedrich Pratsch  
und Sibylle Pratsch-von Randow

zwei Geschwister

SCHULBILDUNG:	1984-1988	Grundschule An der Landwehrstraße, in Moers
	1987	ein Jahr Auslandsaufenthalt in Brasilien, mit Besuch einer Privatschule in Landessprache
	1988-1997	Gymnasium Adolfinum in Moers
	1997	Abitur

STUDIUM:	Okt. 1997 - Feb. 2003	Studium der Veterinärmedizin an der Universität Leipzig
----------	--------------------------	--

STUDENTISCHE NEBENTÄTIGKEIT:	WS 99/00	Studentische Hilfskraft im Anatomischen Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
---------------------------------	----------	--

STUDENTISCHE PRAKTIKA:	1999	Landwirtschaftliches Praktikum in Neukirchen- Vluyn
	2001	Praktikum in einer Tierarztpraxis in Moers
		Praktika in Tierarztpraxen in Moers

---

	2002	Schlachthofpraktikum in Krefeld und Neuss
--	------	---

---

APPROBATION:	2003	
--------------	------	--

---

BERUFSTÄTIGKEIT:	März- April 2003	Hospitanz in einer Tierarztpraxis in Moers
	Mai- August 2003	Teilzeittätigkeit als Tierärztin in einer Tierarztpraxis in Moers
	Juli- Oktober 2005	Anstellung als Tierärztin in einer Kleintierpraxis in Neuss
	seit November 2005	Anstellung als Tierärztin in einer Tierarztpraxis in Krefeld

---

DISSERTATION:	2003 - 2005	Erstellung einer Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie am Universitätsklinikum Essen.
---------------	-------------	---

---

Krefeld, 09. Juli 2006

## Danksagung

Zuvorderst danke ich Herrn Professor Dr. R. Ansorg für die freundliche Überlassung des Themas sowie die Bereitstellung aller benötigter Materialien und Geräte. Ich bedanke mich für die konstruktiven Gespräche und weiterführenden Kritiken während der Erstellung dieser Arbeit.

Des Weiteren gebührt mein herzlicher Dank Frau Dr. Ch. Scherer, die mir während der gesamten Dauer der Studien bei technischen, organisatorischen und fachlichen Fragen zur Seite stand. Herrn Witold Bartosik und Frau Ute Hohmann danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Gaschromatographie sowie der Datenverwaltung der erzielten Ergebnisse. Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Nährmedienlabors danke ich für tatkräftige Hilfe bei der Herstellung der Nährböden. Schließlich bedanke ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie für die freundliche Aufnahme.

Danken möchte ich außerdem Frau Sabine Schönfeldt und Herrn Stephan Pratsch für geduldiges Korrekturlesen meines Manuskriptes.